

**Aktivierung und Freisetzung von TGF  $\beta$ 1 durch  
*Porphyromonas gingivalis* und dessen  
Cysteinproteinasen aus Gingivafibroblasten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae  
dentariae

(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Nicole Wölke

geboren am 16. Januar 1977 in Erfurt

## Gutachter

1. PD Dr.S. Eick, Jena
2. Prof. Dr. Dr. P. Hyckel, Jena
3. Prof. Dr. H. Jentsch, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.07.2009

## Abkürzungsverzeichnis

*A. actinomycetemcomitans*

APS

Aqua dest./dH<sub>2</sub>O

Arg-Gingipain

ATCC

BSA

cDNA

CO<sub>2</sub>

DMEM

DNA

dNTP

ECL

EDTA

ELISA

FKS

FMLP

HRgpA

IgA

IgE

IL

Kgp

kgp

LAP

LPS

Lys-Gingipain

MMP

mRNA

OD

*P. gingivalis*

PAGE

PBS

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Ammoniumpersulfat

destilliertes Wasser

argininspezifische Cysteinproteinase

American Type culture collection

bovine serum albumin

complementary DNA

Kohlendioxid

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Desoxyribonukleinsäure

Desoxyribonukleosidtriphosphate

Enhanced chemoluminescence

Ethylendiamintetraessigsäure

Enzyme-linked immunosorbent assay

Fetales Kälberserum

Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin

argininspezifische Cysteinproteinase

Immunglobulin A

Immunglobulin E

Interleukin

lysinspezifische Cysteinproteinase

Gen, das für Kgp kodiert

latenz assoziiertes Peptid

Lipopolysaccharide

lysinspezifische Cysteinproteinase

Matrix-Metall-Proteinase

messenger Ribonucleinacid

optische Dichte

*Porphyromonas gingivalis*

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Phosphat Buffered Saline

PCR	Polymerase-Kette-Reaktion
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
rgpA	Gen, das für HRgpA kodiert
RgpB	argininspezifische Cysteinproteinase
rgpB	Gen, das für RgpB kodiert
RLT-Puffer	RNeasy Lysis Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
RPE1	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase
RT	reverse Transcription
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	sodium dodecyl sulfate/Natriumdodecylsulfat
Smurf	Smad Ubiquitin Regulatory Factor
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF β	Transforming Growth Factor β
TLCK	N-α-tosyl-L-lysiny-chloromethylketon
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris-HCL	Tris Hydrochloride Buffer
TTBS/TBST	Tween in Tris-buffered saline/TBS Tween

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2. 1. Pathogenese der Parodontitis.....	4
2. 2. <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	6
2. 3. TGF $\beta$ 1.....	11
<b>3. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
4. 1. Verwendete Bakterien, Zellen, Gingipaine und Inhibitoren.....	18
4. 2. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und des aktiven TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten.....	21
4. 3. Aktivierung von TGF $\beta$ 1.....	27
4. 4. Bestimmung von TGF $\beta$ 1 mittels ELISA.....	32
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
5. 1. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten.....	35
5. 1. 1. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> aus Gingivafibroblasten.....	35
5. 1. 2. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Gingipaine) aus Gingivafibroblasten.....	38
5. 1. 3. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 nach Inhibition der Cysteinproteinasen von <i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i> aus Gingivafibroblasten.....	40
5. 1. 4. Ergebnisse für die mRNA-Analyse.....	45
5. 2. Aktivierung von TGF $\beta$ 1.....	46
5. 2. 1. Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	46
5. 2. 2. Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Gingipaine).....	48
5. 2. 3. Ergebnisse für die Westen Blot-Analyse.....	50

<b>6. Diskussion.....</b>	<b>51</b>
6. 1. Material und Methoden.....	51
6. 2. Synthese und Freisetzung von TGF $\beta$ 1.....	53
6. 3. Aktivierung von TGF $\beta$ 1.....	58
<b>7. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>61</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>72</b>

## 1. Zusammenfassung

*Porphyromonas gingivalis* gehört zu den wichtigsten Bakterienspezies bei parodontalen Erkrankungen und wird in Zusammenhang mit aggressiven und schweren chronischen Parodontitiden gesehen. Für die Entfaltung seiner Pathogenität bedient sich *P. gingivalis* verschiedener Virulenzfaktoren. Dazu gehören Fimbrien, Lipopolysaccharide, Hitzeschockproteine, Fettsäuren, Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Indol, und Cysteinproteinasen.

Schwerpunkte der Forschung der letzten Jahre waren die arginin- und lysinspezifischen Cysteinproteinasen. In der Pathogenese parodontaler Erkrankungen spielen bei den Wechselwirkungen zwischen Wirtszellen und Bakterien auch Zytokine, zelluläre Botenstoffe, eine wichtige Rolle. Sie bilden komplexe Netzwerke, da sie sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen aufweisen. TGF  $\beta$ 1 repräsentiert eines der bedeutendsten antiinflammatorischen Zytokine.

Ziel dieser Studie war die Analyse verschiedener Bakterienstämme von *P. gingivalis* bzw. der Cysteinproteinasen (Gingipaine) in Bezug auf die Freisetzung von TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten. Weiterhin sollte geklärt werden, inwieweit die *P. gingivalis*-Stämme bzw. die Cysteinproteinasen in der Lage sind, dieses antientzündliche Zytokin zu aktivieren. Durch das Blocken der Cysteinproteinasen mit spezifischen Inhibitoren sollten die Wirkungen der Proteinase auf die Freisetzung und Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 verdeutlicht werden.

Für die Versuche wurden Gingivafibroblasten jeweils mit den beiden klinischen Isolaten *P. gingivalis* M5-1-2 und J374-1, dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277, den Cysteinproteinasen HRgpA, RgpB und Kgp und den mit den Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK versetzten *P. gingivalis*-Stämmen inkubiert. Nach 1,5 und 6 h wurden Proben entnommen und mittels ELISA die Freisetzung von gesamtem und aktivem TGF  $\beta$ 1 ermittelt. Um die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 durch die *P. gingivalis*-Stämme, die Cysteinproteinasen und durch die inhibierten *P. gingivalis*-Stämme zu bestimmen, wurden die Überstände der Gingivafibroblasten mit diesen versetzt und die Proben nach 1,5 h auf aktives TGF  $\beta$ 1 im ELISA-Verfahren

untersucht. Weiterhin wurde die TGF  $\beta$ 1-mRNA-Expression der Fibroblasten nach Stimulierung mit den einzelnen Cysteinproteinasen, dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und dem mit FFrck inhibierten *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 bestimmt. Einen möglichen Abbau von TGF  $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen, durch den Referenzstamm sowie durch den inhibierten Referenzstamm sollte die Western Blot-Analyse aufzeigen.

Die Infektion der Gingivafibroblasten mit den *P. gingivalis*-Stämmen bewirkte eine erhöhte Freisetzung von aktivem TGF  $\beta$ 1, jedoch nicht des gesamten TGF  $\beta$ 1. In der mRNA-Analyse wurde eine erhöhte Transkription von TGF  $\beta$ 1-mRNA durch die *P. gingivalis*-Proteinase HrgpA induziert. Auf Proteinebene wurde ebenso eine erhöhte Freisetzung von TGF  $\beta$ 1 durch die Proteinase HRgpA und Kgp festgestellt. Dies könnte im Zusammenhang mit der Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne stehen, die beide Cysteinproteinasen besitzen. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass die argininspezifischen Cysteinproteinasen HRgpA und RgpB eine Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 bewirken, während nach Zugabe der lysinspezifische Cysteinproteinase Kgp die Menge an aktivem TGF  $\beta$ 1 abnahm. Das deutet auf einen Abbau des aktiven TGF  $\beta$ 1 durch Kgp hin, welcher in der Western Blot-Analyse bestätigt wurde. Der Abbau von aktivem TGF  $\beta$ 1 durch die *P. gingivalis*-Proteinase Kgp, aber auch durch den Stamm *P. gingivalis* ATCC 33277 wurde nachgewiesen. Durch die Zugabe eines Proteinaseinhibitors zu diesem Bakterienstamm waren keinerlei Abbauprodukte von aktivem TGF  $\beta$ 1 mehr nachweisbar.

Somit konnte gezeigt werden, dass die *P. gingivalis*-Proteinasen einerseits für eine Freigabe und Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 und andererseits für einen Abbau von TGF  $\beta$ 1 verantwortlich sind. *P. gingivalis* stört damit das Netzwerk der Zytokine, indem er deren Freisetzung aus dem Wirtsgewebe anregt, diese Zytokine aber auch abbaut und moduliert so die Immunantwort.



## 2. Einleitung

In der Zahnheilkunde ist die Parodontitis neben der Karies die zweithäufigste Erkrankung und zählt ebenso wie diese zu den Volkskrankheiten. Beide Erkrankungen werden zwar durch Prophylaxe in ihrer Bedeutung zurückgedrängt, aber die Parodontitis zeigt mit zunehmendem Lebensalter Progredienz. Bedingt durch den demografischen Wandel wird sie damit zu einem volkswirtschaftlichen Faktor.

So leidet etwa jeder zweite Deutsche an einer therapiebedürftigen Parodontitis (Hetz 2000), welche nach der Karies mit 27,5 Prozent aller Extraktionen die zweitgrößte Indikationsgruppe zur Zahnentfernung darstellt (Glockmann und Köhler 1998). Besonders die möglichen Folgen entzündlicher Parodontalerkrankungen für den Gesamtorganismus rücken zunehmend in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses.

Die Parodontitis ist eine entzündliche, durch bakterielle Beläge verursachte Erkrankung aller Anteile des marginalen Parodonts, d. h. der Gingiva, des Desmodonts, des Wurzelzements und des Alveolarknochens, mit fortschreitendem Verlust von Stützgewebe. Sie kann einzelne, mehrere oder alle Zähne betreffen und dabei können unterschiedliche Stadien der Erkrankung gleichzeitig vorliegen. Schweregrad und Verlauf können durch anatomische (z. B. Engstand der Zähne), funktionelle oder systemische Faktoren beeinflusst werden. Zu den Symptomen zählen Rötung, Schwellung und Blutungsneigung der marginalen Gingiva, Zahnfleischtaschen mit Verlust von Stützgewebe und dadurch bedingt eine erhöhte Zahnbeweglichkeit sowie Zahnwanderungen und Abszesse (Hellwig et al. 2007).

Aufgrund der unterschiedlichen Ätiologie und Schwere der Erkrankung kann man verschiedene Parodontitisformen unterscheiden. Die seit dem „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions (1999)“ gültige Einteilung der Parodontalerkrankungen klassifiziert die Krankheitsformen altersunabhängig - basierend auf klinischen, radiologischen und anamnestischen Kriterien sowie nach den durch verschiedene Allgemeinerkrankungen veränderten

Wirtsfaktoren (Armitage 1999). Es werden unterschieden: chronische Parodontitiden, aggressive Parodontitiden und Parodontitiden als Manifestation von Systemerkrankungen, wobei vor allem Bluterkrankungen, genetische Störungen und Stoffwechselerkrankungen eine Rolle spielen. Weiterhin definiert man nekrotisierende Parodontalerkrankungen, Parodontalabszesse, Parodontitiden im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen sowie entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände.

## 2. 1. Pathogenese der Parodontitis

Die Plaque ist der hauptsächliche Verursacher von Parodontitis. In mittlerweile klassischen Studien zu kurzzeitig bestehender, experimentell ausgelöster Gingivitis konnte gezeigt werden, dass die Symptome der gingivalen Entzündung, wie Blutung, Rötung und Schwellung vollständig reversibel sind, wenn eine entsprechende Mundhygiene wieder aufgenommen wird (Löe et al. 1965). An mehr als 50 % der Stellen, die eine jahrelang persistierende gingivale Entzündung aufweisen, kommt es zu einem Wechsel von der reversiblen Gingivitis hin zur Parodontitis mit einem irreversiblen Abbau des Zahnhalteapparates (Schätzle et al. 2003).

Die Mundhöhle bildet für eine Vielzahl von Mikroorganismen ein günstiges Biotop. Trotzdem sind nur wenige an der Schädigung des Parodonts beteiligt (Moore und Moore 1994, Socransky und Haffajee 1994). Zu den parodontopathogenen Keimen gehören unter anderem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Streptococcus constellatus*, *Prevotella intermedia* und *Porphyromonas gingivalis* (Socransky et al. 1998, Page und Kornmann 1997).

In der Ätiologie entzündlicher Erkrankungen des Parodonts spielen bestimmte anaerobe Bakterienspezies eine entscheidende Rolle (Schilke et al. 1995). Mehrere Komplexe verschiedener parodontopathogener Keime werden identifiziert. Der „rote“ Komplex, zu welchem auch *P. gingivalis* zählt, ist auffällig mit den klinischen Parametern Taschentiefe und Blutung auf Sondieren in Bezug zu bringen (Socransky

et al. 1998). Essentiell für die Krankheitsaktivitäten erscheinen nicht nur die Präsenz von *P. gingivalis*, ob allein oder in gemischten Infektionen mit anderen Bakterien, sondern auch die mögliche Abwesenheit nützlicher Bakterien sowie immunologische Defizite des Wirts (Haffajee und Socransky 1994, Socransky und Haffajee 1992).

Die Plaque setzt große Mengen von Metaboliten frei, die durch das Saumepithel in das parodontale Bindegewebe diffundieren und eine gingivale Entzündung provozieren. Zu diesen Substanzen gehören Fettsäuren wie die Butter- und Propionsäure, Peptide wie das N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) und besonders die Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien. Zellen des Saumepithels reagieren auf diese Stimuli mit der Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8), Prostaglandin E<sub>2</sub>, (PGE<sub>2</sub>), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) und von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) (Wilson et al. 1996).

Die Substanzen bakteriellen oder epithelialen Ursprungs diffundieren in das parodontale Bindegewebe und führen dort zur Verstärkung der Entzündungsreaktion, indem ortsständige Makrophagen, Fibroblasten und perivaskuläre Mastzellen zur weiteren Freisetzung proinflammatorischer Substanzen, wie IL-1, Prostaglandinen, MMPs und Histamin, stimuliert werden. Dadurch wird ein chemotaktisch wirksamer Gradient für die Heranführung von Leukozyten etabliert, die aus den parodontalen Blutgefäßen in das Entzündungsgebiet austreten (Kornman et al. 1997). Die dafür notwendige Aktivierung der Endothelzellen und somit die Expression der für die Extravasation der Leukozyten (hauptsächlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten, PMN) erforderlichen Adhäsionsmoleküle kann entweder direkt durch das LPS oder indirekt über stimulierte Monozyten erfolgen (Darveau et al. 1997).

Die PMN migrieren dem für sie spezifischen Gradienten von Chemokinen, wie IL-8, folgend (Bickel 1993) schließlich durch das Saumepithel hindurch und bilden eine Barriere zwischen der apikalen Plaque und dem parodontalen Gewebe (Theilade und Attström 1985).

B-Zellen differenzieren zu Antikörper produzierenden Plasmazellen und bilden gegen Bakterien der Plaque gerichtete Immunglobuline - hauptsächlich IgG (Ebersole et al. 1993), wobei die in der Sulkusflüssigkeit nachweisbaren Antikörper sowohl aus

lokaler Produktion als auch aus dem Serum stammen. Die Antikörper opsonieren die Bakterien, führen danach zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Erleichterung der Phagozytose und inaktivieren bakterielle Virulenzfaktoren wie LPS, Leukotoxin, äußere Membranproteine oder Fimbrien (Ebersole 2003). Durch T-Zellen werden die Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  hochreguliert, welche schließlich durch Stimulation der Osteoklasten zum Knochenabbau führen (Taubmann und Kawai 2001).

Der Besiedelung mit pathogenen Mikroorganismen kann eine Gewebeerstörung folgen, entweder durch die Aktivierung von einem oder mehreren der fünf Abbauwege (MMP-pathway, Plasminogen-abhängiger pathway, phagocytic pathway, PMN-serine proteinase pathway und osteoklastische Knochenresorption) oder durch direkte Spaltung von extrazellulären Matrixbestandteilen durch mikrobielle Proteinase (Birkedal-Hansen 1993).

Die bakterielle Besiedelung des gingivalen Sulkus und der parodontalen Gewebe sowie die in der Folge ablaufenden Destruktionsprozesse sind kritische Vorgänge in der Pathogenese der entzündlichen Parodontalerkrankungen. Die Gewebeintegrität des Parodonts wird in nicht unwesentlichem Maße von der Fibroblastenfunktion bestimmt. Explantierte humane gingivale Fibroblasten werden als gut geeignetes experimentelles Modellsystem genutzt, um den Effekt von parodontopathogenen Bakterien auf die Zellvitalität und Zellmorphologie zu untersuchen (Staudte et al. 2003). Beispielsweise konnte für den Bakterienextrakt von *P. gingivalis* in verschiedenen Untersuchungen eine massive zytotoxische Wirkung auf gingivale und periapikale Fibroblasten nachgewiesen werden (Johansson et al. 1996, Loomer et al. 1994, Yamasaki et al. 1998).

## **2. 2. *Porphyromonas gingivalis***

Der Nachweis von *P. gingivalis* wird in Zusammenhang mit aggressiven Parodontitiden (Loesche et al. 1985) und schweren Formen der chronischen Parodontitis (Slots 1979, Novak und Novak 1996) gesehen.

Die Blutung auf Sondieren ist ein bekanntes Zeichen der Parodontitis, wird als Kriterium für die Diagnose gingivaler Entzündungen gebraucht und gilt als Vorhersagewert für die Progression der Erkrankung. Dieses Zeichen korreliert positiv mit der Präsenz von *P. gingivalis* in der Parodontaltasche (Albandar et al. 1990).

*P. gingivalis* ist ein anaerobes, gramnegatives Stäbchen mit Kapsel und Fimbrien. Für das Wachstum sind Hämin und zumeist Vitamin K erforderlich. Nach 7 – 10 Tagen anaerober Bebrütung sind grünschwarte Kolonien sichtbar. Der Gattungsname weist auf die Fähigkeit zur Porphyrinbildung hin. Die initiale Infektion mit *P. gingivalis* in der Mundhöhle geschieht durch die Übertragung von infizierten Individuen (Greenstein und Lamster 1997).

Für die Entfaltung seiner Pathogenität bedient sich *P. gingivalis* verschiedener Virulenzfaktoren: Fimbrien, Cysteinproteinasen, Lipopolisaccharide und Hitzeschockproteine. Intensive Studien mit *P. gingivalis* haben gezeigt, dass eine große Menge der potentiellen Virulenzfaktoren auf molekularer Ebene definiert sind (Lamont und Jenkinson 1998).

Fimbrien ermöglichen es den Bakterien, an Membranrezeptoren der Zellen zu binden und in das Zellinnere einzudringen (Ellen 1999, Sojar et al. 2002). Die Kolonisation der subgingivalen Regionen wird erleichtert durch die Fähigkeit von *P. gingivalis* an verfügbare Substrate, wie adsorbierte Speichelmoleküle, Matrixproteine, Epithelzellen und Bakterien, die bereits als Biofilm auf Zähnen und epithelialen Oberflächen bestehen, zu adhären. Die Bindung an all diese Substrate vermittelt variationsreiche Regionen des Fimbrillins, der strukturellen Untereinheit der Hauptfimbrien (Lamont und Jenkinson 1998). Nach der Adhäsion an die Zelloberfläche erfolgt die Internalisierung von *P. gingivalis* in das Zytoplasma der Epithelzelle (Lamont et al. 1992).

*P. gingivalis* besitzt starke proteolytische Aktivität. Die von ihm produzierten und freigesetzten Cysteinproteinasen stellen einen Hauptvirulenzfaktor dieses Bakteriums dar. Diese Cysteinproteinasen werden in der Literatur unter

verschiedenen Bezeichnungen geführt - so unter anderem Trypsin-like-Enzymes, Gingipaine und Gingivaine (Travis et al. 1997).

Diese Gingipaine sind Produkte von drei Genen, welche die Cysteinproteinasen kodieren. Die argininspezifische Cysteinproteinaseaktivität (Gingipain R) entstammt zwei Genen: *rgpA* und *rgpB*. Die lysinspezifische Cysteinproteinase (Gingipain K) wird von einem einzigen Gen, *kgp*, kodiert (Potempa et al, 1995). Potempa et al. (1997) haben gezeigt, dass die Konzentration der Arg-Gingipaine (HRgpA, RgpB) immer etwa dreimal höher ist als die des Lys-Gingipains (Kgp); insgesamt machen die Gingipaine mehr als 85 % der proteolytischen Aktivität aus.

HRgpA ist ein nichtkovalenter aber sehr stabiler Komplex einer katalytischen Domäne und einer Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne (Pavloff et al, 1995). RgpB besitzt nur eine katalytische Domäne mit einer identischen Primärstruktur von der katalytischen Untereinheit von HRgpA (Mikolajczyk-Pawlinska et al, 1998).

Kgp hat wiederum eine katalytische Domäne und eine Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne (Pavloff et al, 1997).

Die Primärstruktur der Gingipaine in Form ihrer Aminosäuresequenz hat kleine signifikante Unterschiede zu bekannten Proteinen. Das zeigt, dass Gingipaine besondere Proteinase sind. Sie werden einer separaten Familie der Cysteinproteinase zugeordnet - der Familie C25 (Imamura 2003).

Die Gingipaine R induzieren eine Steigerung der Gefäßpermeabilität durch die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems und einer anschließenden Freisetzung von Bradykinin (Hinode et al. 1992, Kaminishi et al. 1993, Imamura et al. 1994 und Imamura et al. 1995). Bradykinin ist ein Nonapeptid, verursacht Schmerz sowie eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und induziert einen Schock bei intravenöser Verabreichung in Tierexperimenten (Imamura 2003). Durch die Zugabe von Leupeptin, einem für Gingipain R spezifischen Inhibitor, und durch Anti-RgpB-Antikörper wurde die Steigerung der Gefäßpermeabilität gehemmt. Das zeigt, dass Gingipain R allein für die Erhöhung der Gefäßpermeabilität verantwortlich ist

(Imamura et al. 1994). In dieser Aktivität gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen HRgpA und RgpB (Imamura et al. 2000).

Im Gegensatz dazu ist Gingipain K nicht fähig, eine Steigerung der Gefäßpermeabilität zu induzieren. Jedoch wirkt es synergistisch mit Gingipain R; beide führen zur Freisetzung von Bradykinin (Imamura et al. 2003). Somit stellen beide Gingipaine wichtige Faktoren für die Steigerung der Gefäßpermeabilität dar und tragen potentiell zur Sulkusfluidproduktion und Ödembildung in den mit *P. gingivalis* infizierten Parodontitisregionen bei. Auf diese Weise beschaffen die Gingipaine einen kontinuierlichen Bestand an nötigen Nährstoffen, die für bakterielles Wachstum und Virulenz wichtig sind (Imamura 2003).

Die Gingipaine R induzieren eine Aktivierung des Blutgerinnungssystems und setzen Thrombin über eine Kaskade von Blutgerinnungsfaktoren frei. Thrombin ist ein extrem starker Plättchenaktivator und wandelt Fibrinogen in ein Fibringerinzel um; somit verschließt es Gefäßdefekte. Außerdem spielt es eine zentrale Rolle in der Hämostase. Thrombin steigert die Gefäßpermeabilität (DeMichele et al. 1990) und induziert die Leukozyten-Chemotaxis (Bizios et al. 1986, Bar-Shavit et al. 1983). Ebenso stimuliert Thrombin die Knochenresorption durch Osteoklasten über einen Prostaglandin-abhängigen Weg (Hoffmann et al. 1986). Somit ist die unkontrollierte Produktion von Thrombin wahrscheinlich mit der Progression der Parodontitis und der Alveolarknochenresorption verbunden (Imamura 2003).

R-Gingipain reduziert die Plasmagerinnungszeit, wobei HRgpA fünffach effizienter im Vergleich zu RgpB ist (Imamura et al. 1997). Unter Anwesenheit von Calciumionen und Phospholipiden ist diese Funktion von HRgpA noch mehrfach verstärkt - nicht aber die von RgpB (Imamura et al. 1997, Imamura et al. 2001). Dies deutet auf eine entscheidende Rolle der Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne hin (Imamura 2003). In Bezug auf den Mechanismus der Plasmagerinnungszeitförderung aktivieren diese Proteinase die Gerinnungsfaktoren IX (Imamura et al. 2001), X (Imamura et al. 1997) und Prothrombin (Imamura et al. 2001).

Gingipaine induzieren die Spaltung von Fibrinogen und Fibrin. Sie spalten Fibrinogen innerhalb von Minuten (Pike et al. 1996) und verhindern somit die Koagulation - zusätzlich können sie Fibrin gel auflösen (Imamura et al. 2000). Dies trägt zur Blutungsneigung der von Parodontitis betroffenen Gewebe bei (Imamura 2003).

Im Auflösen der Blutgerinnsel ist Kgp weniger stark wirksam als Gingipain R - jedoch verlängert Kgp die Plasmagerinnungszeit effizienter (Imamura et al. 1995). Die Fähigkeit von *P. gingivalis* die Plasmagerinnungszeit zu verlängern, konnte durch Kgp-spezifische Inhibitoren gehemmt werden (Imamura et al. 1995). Das zeigt, dass die fibrinolytische Aktivität des Bakteriums hauptsächlich dem Lysin-Gingipain (Kgp) zuzuschreiben ist.

Die Fähigkeit zur Modulation von Immunreaktionen des Wirtes ist entscheidend für das Überleben und den Erhalt der Pathogenität über einen langen Zeitraum. Gingipaine haben einen Mechanismus entwickelt, das Komplementsystem für ihren eigenen Nutzen zu gebrauchen. Sie sind in der Lage C3, einen zentralen Faktor des Komplementsystems abzubauen (Wingrove et al. 1992), wodurch eine Aggregation der Bakterien bzw. deren Opsonierung für eine erleichterte Phagozytose verhindert wird (Lamont und Jenkinson 1998).

Die Gingipaine sind fähig, Wirts-C5a-Rezeptoren an der Oberfläche der attackierenden neutrophilen Granulozyten abzubauen (Jagels et al. 1996). Die Zerstörung dieser großen neutrophilen chemotaktischen Proteine führt zum Verlust der Phagozytenfunktion. Daneben können die Gingipaine verschiedene Zytokine, wie IL-6 (Banbula et al. 1999), IL-8 (Mikolajczyk-Pawlinska et al. 1998), IL-1 $\beta$  (Fletcher et al. 1998), TNF- $\alpha$  (Calkins et al. 1998) und Interferon- $\gamma$  (Yun et al. 1999), spalten. Oleksy et al. (2002) haben gezeigt, dass die Gingipaine schnell und effizient die Interleukin-6-Rezeptoren inaktivieren.

Gingipaine bauen die Lipopolysaccharidrezeptoren CD14 von der Oberfläche der Makrophagen ab, dadurch inhibieren sie die Aktivierung von Leukozyten durch den Lipopolysaccharidrezeptor und erleichtern deshalb die Kolonisierung von *P. gingivalis*.



Gingipaine spielen eine Rolle für den Stoffwechsel des Bakterienhaushaltes durch Aufnahme von Aminosäuren von Wirtsproteinen und sind an der Fimbrienreifung beteiligt. Basierend auf den wichtigen Aktivitäten der Gingipaine in der bakteriellen Infektion und der Pathogenese der Parodontitis können die bakteriellen Proteinase Ziele für die Parodontistherapie sein (Imamura 2003).

### **2. 3. TGF $\beta$ 1**

Zytokine sind wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 5 kDa und werden u. a. von T-Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Leukozyten und Fibroblasten gebildet. Sie sind multifunktionell und überlappen in ihren biologischen Aktivitäten (Viček und Le 1994). Zytokine kontrollieren Wachstum und Differenzierung von Leukozyten, fördern die Initialphase der Immunantwort und stimulieren oder supprimieren Effektorfunktionen (Flad und Gemsa 1991).

TGF  $\beta$  gehört zu den Zytokinen zählenden Signalmolekülen. Biochemisch ist TGF  $\beta$  ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 25 kDa, das unter reduzierenden Bedingungen in zwei identische Ketten von 112 Aminosäuren zerfällt. Nur das Dimer ist biologisch aktiv. Die cDNA für TGF  $\beta$  zeigt, dass das Molekül als ein inaktiver Precursor von 391 Aminosäuren vorliegt, aus dem das Monomer von 112 Aminosäuren durch proteolytische Spaltung hervorgeht (Flad und Gemsa 1991).

TGF  $\beta$  gehört zur Familie der multifunktionellen Polypeptid-Wachstumsfaktoren, es ist in die Embryogenese, Entzündung, Regulation der Immunantwort, Angiogenese, Wundheilung und Formation der extrazellulären Matrix involviert. TGF  $\beta$ 1 ist einer der bedeutendsten Faktoren in der Regulation von Infiltration und der Produktion von Reparationsgewebe mit Stimulation von Fibroblasten und Endothelzellen (Cornelini et al. 2003).

Ursprünglich wurde TGF  $\beta$  als Wachstumsfaktor für normale Nierenzellen und Fibroblastenzelllinien von Ratten beschrieben. Es wurde aber bald offensichtlich, dass die biologische Aktivität von TGF  $\beta$  multifunktional ist. TGF  $\beta$  unterdrückt das

Wachstum von vielen epithelialen Zelltypen, während es das Wachstum von mesenchymalen Zellen stimuliert (Gold 1999).

TGF  $\beta$  repräsentiert eines der bedeutendsten antiinflammatorischen Zytokine und existiert in fünf Isoformen. Drei von ihnen (TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2, TGF  $\beta$ 3) kommen in Säugetieren vor (Khalil 1999). Die TGF- $\beta$ -Isoformen sind an zahlreichen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen in unterschiedlichsten Geweben beteiligt. Allgemein spielen sie eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und der Organogenese, der Kontrolle von Wachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose, bei der Wundheilung und dem Remodelling sowie der Karzinogenese. Beispielsweise sind sie für den Immunglobulinklassenwechsel zu IgA in B-Lymphozyten verantwortlich und an der Regulation der Synthese von Akut-Phase-Proteinen beteiligt. TGF  $\beta$  beeinflusst auch die autokrine Stimulation von Osteoblasten und die Biosynthese sowie den Abbau von Kollagen und Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix, weswegen ihm auch eine pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung von Arteriosklerose und Kardiomyopathien beigemessen wird (Löffler und Petrides 1998).

TGF  $\beta$ 1 inhibiert die Expression des Keratinocyte growth factor und des Hepatocyte growth factor auf mRNA- und Proteinebene. Diese beiden Faktoren sind Signalmoleküle, die eine bedeutende Rolle in der Regulation der epithelialen-mesenchymalen Interaktionen spielen. Die verminderte Expression dieser Faktoren durch Fibroblasten im subepithelialen Bindegewebe führt zur Proliferation und apikalen Migration des Saumepithels und somit zur Bildung parodontaler Taschen (McKeown et al. 2003).

Die Regeneration von parodontalem Gewebsverlust durch Parodontalerkrankungen erfordert Zellmigration, -differenzierung und -proliferation. TGF  $\beta$  fördert die Proliferation von parodontalen Ligamentzellen und Gingivafibroblasten und begünstigt somit die Wundheilung (Marcopoulou et al. 2003).

Die Immunantwort des Wirtes auf chronische marginale Parodontitis gegen die Bakterienkolonisierung des dentogingivalen Gebietes wird über Zytokine vermittelt.

Steinsvoll et al. (1999) untersuchten in einer Studie elf Patienten mit chronischer marginaler Parodontitis und sieben Patienten mit gesunder Gingiva. Sie fanden 100-fach mehr TGF  $\beta$ -positive Zellen im entzündeten Parodontalgewebe als in der gesunden Gingiva. TGF  $\beta$ -positive Zellen waren zu 21-29 % Makrophagen, zu 2-3 % T-Zellen, zu 3-9 % B-Zellen, zu 34-35 % neutrophile Granulozyten und zu 7-10 % Mastzellen. Somit wurde festgestellt, dass TGF  $\beta$ 1 ein immunsuppressives Zytokin ist, welches die Wundheilung stimuliert (Steinsvoll et al. 1999). Dafür sprechen auch die Ergebnisse von Skaleric und seinen Mitarbeitern. Sie fanden bei Parodontitispatienten eine signifikant höhere Konzentration an TGF  $\beta$ 1 in Gingivagewebe- und Gingivafluidproben, die aus tiefen parodontalen Taschen gewonnen worden waren, im Vergleich zu weniger betroffenen Lokalisationen (Skaleric et al. 1997).

De Obarrio et al. (2000) verwendeten TGF  $\beta$  als autologen Wachstumsfaktor in der parodontalchirurgischen Behandlung von Knochendefekten. Eine signifikante Reduzierung der Sondierungstiefe und radiographologisch bedeutsame Mengen von neuem Knochen waren früher als 2 Monate postoperativ sichtbar.

#### *Aktivierung von TGF $\beta$ :*

Die Menge des produzierten TGF  $\beta$  wird durch die Induktion von Transkription und Translation von TGF  $\beta$  gesteuert. Die wichtigste Regulierung der TGF  $\beta$ -Aktivität basiert auf der Grundlage, ob TGF  $\beta$  biologisch aktiv oder latent ist. TGF  $\beta$  wird als großes Precursorprotein synthetisiert, das intrazellulär vor seiner Sekretion modifiziert wird. Eine der relevantesten intrazellulären Modifikationen ist die Spaltung der C-terminalen Pro-Region von dem N-terminalen Teil des Proteins. Die C-terminale Pro-Region wird als latency-associated peptide (LAP) bezeichnet, während die N-terminale Region reifes TGF  $\beta$  oder aktives TGF  $\beta$  genannt wird. Trotz der Spaltung bleibt das LAP nicht kovalent mit dem aktiven TGF  $\beta$  verbunden, man bezeichnet es als L-TGF  $\beta$ . L-TGF  $\beta$  kann nicht mit seinem Rezeptor interagieren und hat somit keinen biologischen Effekt, die Präsenz des LAP erleichtert jedoch den Transport (Khalil 1999).

Die Lokalisation von L-TGF- $\beta$  an der Zelloberfläche ist wichtig für seine Aktivierung, wobei hierfür das LAP von L-TGF- $\beta$  entfernt werden muss. *In vitro* kann dies durch extreme pH-Werte oder Erhitzen auf 100°C erreicht werden. Physiologisch ist Plasmin fähig, das LAP vom latenten Komplex zu entfernen. Die Aktivierung des Plasmins aus Plasminogen geschieht durch den Urokinase-Plasminogen-Aktivator und den Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator. Jedoch ist TGF  $\beta$  auch fähig, die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren zu induzieren und daraus resultiert eine Limitierung der Aktivierung von TGF  $\beta$ . Zellen, die Glukose, Stress, Thromboxan ausgesetzt sind, zeigen eine erhöhte Transkription und Aktivierung von TGF  $\beta$  - wahrscheinlich über die Induktion der Proteinkinase C, welche den Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator induziert (Khalil 1999).

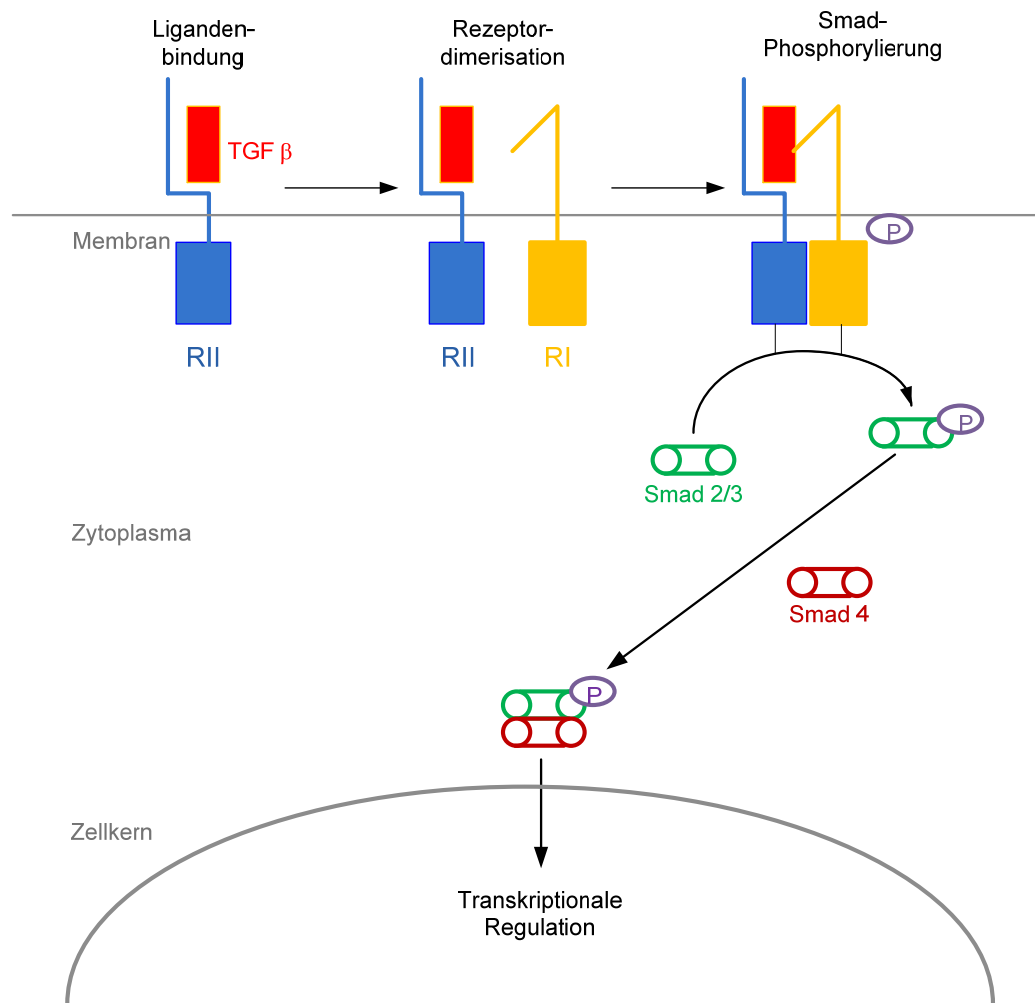
#### *Die TGF $\beta$ -Signaltransduktion:*

TGF  $\beta$ -Isoformen entfalten ihre Wirkung über einen heterodimeren Komplex aus TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I und II. Es handelt sich um transmembrane Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren. Beide Rezeptoren sind ubiquitär vorhanden. Das Vorhandensein beider Rezeptoren ist für ihre Funktion notwendig. Der TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I scheint den TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ II für die Ligandenbindung zu benötigen, während der TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I für die Signaltransduktion unabdingbar ist. Nach Ligandenbindung phosphoryliert und aktiviert der TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ II den TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I (Moustakas et al. 2001, Fernandez et al. 2002).

Der aktivierte Rezeptor wiederum phosphoryliert nun zytoplasmatische, an der Signaltransduktion beteiligte, rezeptorspezifische Proteine: die sog. Smads (Derynck et al. 1996). Es bildet das einzige Substrat des TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I und vermittelt somit die komplexen Wirkungen von TGF  $\beta$ . Das menschliche Genom kodiert für acht Smad-Proteine, die während der gesamten Entwicklung sowie im adulten Gewebe exprimiert werden. Smad 2, 4, 5 und 8 werden durch alternatives RNA-Splicing hergestellt (Moustakas et al 2001). Funktionell werden die Smads in drei Gruppen eingeteilt: rezeptoraktivierte Smads (R-Smads: Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, Smad 8), ein common mediator Smad (Co-Smad: Smad 4) und inhibitorische Smads (I-Smads: Smad 6 und Smad 7) (Moustakas et al. 2001). Unphosphorylierte Smads liegen als Monomere vor. Nach Aktivierung durch den

TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I bilden R-Smads zunächst Homo-Oligomere und schließlich Hetero-Oligomere. Die Phosphorylierung wird durch akzessorische Proteine sowie Gerüstproteine, wie zum Beispiel SARA (Smad anchor for receptor activation), unterstützt und reguliert.

Zunächst bilden Smad 2 und Smad 3 einen Komplex. Nach der Phosphorylierung gehen sie dann eine Bindung mit dem Co-Smad ein. Hierauf wird der hetero-oligomere Komplex Co-Smad-vermittelt in den Zellkern transloziert. Dort interagiert er mit verschiedenen DNA-Bindungsproteinen, Coaktivatoren bzw. –repressoren und induziert oder supprimiert somit die Transkription zahlreicher Zielgene. I-Smads übernehmen eine kompetitive Rolle zu den R-Smads am Rezeptor im Sinne eines negativen Feedbacks und markieren den Rezeptor mit Ubiquitin für die Degradierung, während die R-Smads unter dem Einfluss von sog. SMURF (Smad Ubiquitin Regulatory Factor) inaktiviert werden (Moustakas et al. 2001).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der TGF  $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion durch Smad-Proteine:** Nach Ligandenbindung phosphoryliert und aktiviert der TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ II (RII) den TGF  $\beta$ -Rezeptor Typ I (RI). Smad 2 und Smad 3 bilden einen Komplex, der von dem aktivierten Rezeptor wiederum phosphoryliert wird. Durch die Bindung mit dem Co-Smad entsteht ein hetero-oligomeres Komplex, der in den Zellkern transloziert. Dort induziert oder supprimiert er somit die Transkription zahlreicher Zielgene. (Abbildung erstellt nach Angaben von Moustakas et al. 2001 und Fernandez et al. 2002)

### 3. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten. Es soll geklärt werden, inwieweit der Bakterienstamm *P. gingivalis* bzw. seine Cysteinproteinasen in der Lage sind, die Freisetzung dieses antientzündlichen Zytokins aus infizierten Gingivafibroblasten zu stimulieren. Dabei wird sowohl gesamtes (inaktives und aktives) und aktives TGF  $\beta$ 1 gemessen. Ein anderer Aspekt dieser Arbeit widmet sich der Fragestellung, inwieweit eine Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 durch die Bakterienstämme und ihrer Cysteinproteinasen in den Überständen der infizierten Gingivafibroblasten stattfindet.

Es werden dabei drei *P. gingivalis*-Stämme in die Untersuchungen einbezogen: *P. gingivalis* ATCC 33277 als internationaler Referenzstamm und *P. gingivalis* M5-1-2 bzw. *P. gingivalis* J374-1 als Patientenisolate. Hierbei sollen mögliche stammspezifische Unterschiede festgestellt werden.

Die wichtigsten Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* sind arginin- und lysinspezifische Cysteinproteinasen. Es soll geklärt werden, inwieweit diese Cysteinproteinasen für die Freigabe von TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten bzw. für die Aktivierung dieses Wachstumsfaktors verantwortlich sind. Dabei sollen Wirkungsunterschiede festgestellt und eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Cysteinproteinasen geklärt werden.

Ein weiterer Ansatz, der die Wirkung der Cysteinproteinasen aufzeigen soll, stellt das Blockieren durch spezifische Inhibitoren dar. Bei den durchgeführten Versuchen sollen die Proteinaseinhibitoren FFrcK (Blockieren aller Cysteinproteinasen), Leupeptin (Blockieren der argininspezifischen Cysteinproteinasen) und TLCK (Blockieren der lysinspezifischen Cysteinproteinasen) untersucht werden.

Insgesamt sollen die Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Virulenzeigenschaften von *P. gingivalis* beitragen.

## 4. Material und Methoden

### 4. 1. Verwendete Bakterien, Zellen, Gingipaine und Inhibitoren

#### Bakterienstämme

Für die Testserien wurden drei verschiedene Stämme der Spezies *P. gingivalis* verwendet. Es handelte sich dabei um den Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie um die beiden Stämme *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1, die aus der Plaque von Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis isoliert wurden.

Die Bakterienstämme wurden subkultiviert, indem Blut-Agar-Platten mit *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* J374-1 beimpft und im Brutschrank anaerob bei 37°C inkubiert wurden.

Nach 48 h wurde eine Bakteriensuspension hergestellt.

#### *Herstellung der Bakteriensuspension:*

Unter der Laminarbox wurde das einfach konzentrierte Medium 199 in drei Reagenzgläser abgefüllt und mit jeweils einem Bakterienstamm (*P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* J374-1) versetzt, der mittels eines Wattestäbchens von der Schaedler-Agar-Platte entnommen wurde.

Die Bakteriendichte wurde unter dem Fotometer eingestellt. Zur Eichung des Fotometers wurde eine Küvette mit 1 ml einfach konzentriertem Medium 199 gefüllt, in das Gerät geschoben und dann die Skala bei 640 nm auf Null gestellt. Eine zweite Küvette, welche 1 ml einer Bakteriensuspension enthielt, wurde fotometrisch mit der ersten verglichen. Die Bakteriensuspension wurde vorsichtig verdünnt, bis die optische Dichte 0,1 betrug. Dieser Wert entsprach in etwa  $10^8$  Bakterien/ml.

Dies wurde mit allen drei *P. gingivalis*-Stämmen durchgeführt.



### **Gingivafibroblasten**

Die Fibroblasten entstammen der Gingiva aus der Region eines dritten Molaren, welcher bei einem gesunden 18-jährigen männlichen Patienten extrahiert wurde. Das anhaftende Gewebe wurde entnommen. Das Einverständnis der Ethikkommission lag vor.

Das Epithel wurde entfernt und das Gewebe mittels Skalpell auf einem Objektträger zerkleinert. Unter Zugabe von Trypsin wurde es in Geweberöhrchen 12 h bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM plus 10% FKS aufgenommen und in Gewebekulturflaschen bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und das Zellwachstum unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach 14 Tagen konnten die Fibroblasten selektiert und in Gewebekulturflaschen passagiert werden. Für die weitere Verwendung wurden die Fibroblasten in der dritten Passage entnommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### *Passagieren der Fibroblasten:*

Für die Zellpassage wurde eine dicht mit Fibroblasten bewachsene Gewebekulturflasche benötigt. Alle Arbeiten erfolgten unter der Laminarbox, die für ein steriles Arbeiten sorgt.

Von den Zellkulturflaschen wurde das Zellkulturmedium DMEM mit 10% FKS abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, um das restliche FKS abzuspülen, welches das Trypsin in seiner Wirkung inhibieren würde. Im nächsten Schritt wurden 1 ml Trypsin EDTA-Lösung (5%ig) zupipettiert und die Zellen für 10 min in den Brutschrank (37° und 5% CO<sub>2</sub>) gegeben. Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet Proteine der extrazellulären Matrix, auf diese Weise lösen sich die adhärennten Zellen vom Boden des Kulturgefäßes ab - sichtbar als milchig trübe Zellhaufensammlungen.

Die Zugabe von 2 ml Medium mit 10% FKS stoppte die Wirkung des Trypsins. Dieses Zellgemisch wurde im Reagenzglas bei einer Geschwindigkeit von

1179 U/min, das entspricht 400 g, 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und verworfen.

Die Zellen wurden in 12,5 ml Medium gegeben und durchmischt. Mittels Pipette wurden 24 Wells mit 500 µl (= 12 ml + Pipettiverlust) abgefüllt und für 48 h in den Brutschrank gegeben, damit die Zellen eine Monolayerschicht ausbilden konnten. Nach 48 h wurde die Zellschicht unter dem Mikroskop überprüft.

### **Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* (Gingipaine)**

Die im Versuch verwendeten Proteinase waren:

- HrgpA (5,1 µM)
- RgpB (23 µM)
- Kgp (7,1 µM)

Sie wurden bei -18°C aufbewahrt und vor Versuchsbeginn aufgetaut.

Die Gingipaine mussten vor dem Versuch aktiviert werden.

#### *Herstellung des Aktivierungspuffers:*

Dafür wurde 1,1 M Cysteinhydrochlorid verwendet, das stark sauer ist. Zur Neutralisation eignet sich Natriumhydroxyd. Es wurden 86 µl Cysteinhydrochlorid mit 14 µl 5 M Natriumhydroxid gemischt. Diese Mischung wurde mit Calciumchlorid im Verhältnis 1:99 vermengt, d. h. 50 µl Cysteinhydrochloridgemisch mit 4950 µl Calciumchlorid ergaben 5 ml Aktivierungspuffer.

#### *Aktivierung der Gingipaine:*

Zur Herstellung von jeweils 30 µl Lösung wurden 12,75 µl des Gingipains HRgpA in ein Eppendorf-Tube pipettiert und 17,25 µl PBS hinzugegeben. In einem zweiten Eppendorf-Tube wurden 2,6 µl RgpB mit 27,4 µl PBS und in einem dritten Eppendorf-Tube 8,45 µl Kgp mit 21,55 µl PBS gemischt.

Dies ergab jeweils 30 µl des jeweiligen Gingipains mit PBS. Dieses Gemisch wurde 1:1 mit dem Aktivierungspuffer versetzt und für 15 min bei 37°C in den Brutschrank gegeben, damit die Aktivierung stattfindet.

Die Lösung hatte eine Endkonzentration von 1 µM.

### **Inhibitoren**

Jeder Stamm wurde mit drei verschiedenen Inhibitoren versetzt:

- FFrcK inhibiert lysin- und argininspezifische Cysteinproteinaseaktivität, also beide Proteinase.
- Leupeptin hemmt die Aktivität von argininspezifischen Proteinase.
- TLCK-Hydrochlorid inhibiert lysinspezifische Cysteinproteinaseaktivität, also das Kgp.

Die Inhibitoren wurden 15 min bei 37 °C vor dem Versuch der Bakteriensuspension im Verhältnis 1:100 (Endkonzentration: FFrcK 5µM, Leupeptin und TLCK-Hydrochlorid je 1µM) zugesetzt und dann auf die Fibroblasten gebracht. Eine Vergleichsprobe jeden Stammes wurde ohne Inhibitor angesetzt.

## **4. 2. Freisetzung des gesamten TGF β1 und aktiven TGF β1 aus Gingivafibroblasten**

### **Freisetzung des gesamten TGF β1 und aktiven TGF β1 durch *Porphyromonas gingivalis* aus Gingivafibroblasten**

Zunächst wurde jeder Bakterienstamm (*P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* J374-1) direkt auf Fibroblasten gebracht.

Dann wurden die Überstände nach 1,5 und nach 6 h entnommen und mittels ELISA auf gesamtes TGF β1 und aktives TGF β1 untersucht.

**Versuchsdurchführung:**

Von zwei 24-Well-Platten, 48 h zuvor mit Gingivafibroblasten passagiert, wurde das Medium mittels Vacusafe abgesaugt, die Platten einmal mit PBS gewaschen.

Die Bakteriensuspensionen wurden für jeden Stamm (*P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2, *P. gingivalis* J374-1), wie zuvor beschrieben, hergestellt. Diese wurden im Verhältnis 1:10 mit DMEM ohne Serumzusatz (Medium für Fibroblasten) versetzt (0,45 ml Bakteriensuspension + 4,05 ml Medium). Die Kontrolle wurde, ebenfalls in dem Verhältnis 1:10, aus 0,45 ml PBS und 4,05 ml Medium hergestellt.

Es wurden 1 ml von diesen jeweiligen Bakteriensuspensionen bzw. der Kontrolle auf je ein Well gegeben. Je Stamm und Kontrolle wurden 4 Wells beschickt. Nach 1,5 und nach 6 h wurden je 2 Proben der Überstände entnommen, in Eppendorf-Gefäße pipettiert und 5 min bei 10 000 g zentrifugiert. Davon wurden 750 µl Überstand abpipettiert, in Cryoröhrchen gegeben, beschriftet (Versuch, Bakterienstamm, Datum, Zeitpunkt der Probenentnahme) und bis zur Weiterverarbeitung (ELISA) bei -20°C gelagert.

**Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1 und aktiven TGF  $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* (Gingipaine) aus Gingivafibroblasten**

In einem weiteren Versuch wurden die Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp auf die Fibroblasten gebracht und die Freisetzung des gesamten und aktiven TGF  $\beta$ 1 mittels ELISA analysiert.

**Versuchsdurchführung:**

Mit jedem der aktivierten Gingipaine wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Die Molarität der Gingipaine wurde so eingestellt, dass der Versuch mit 100 nM begonnen werden konnte. Die Gingipaine wurden so mit DMEM verdünnt, dass sie in den jeweiligen Endkonzentrationen von 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zur Verfügung standen.

Zwei Kontrollen wurden hergestellt: eine aus 60 µl Aktivierungspuffer und 540 µl DMEM und eine aus 60 µl PBS und 540 µl DMEM.

48 h vor eigentlichem Versuchsbeginn wurden eineinhalb 24-Well-Platten mit Fibroblasten, wie zuvor beschrieben, vorbereitet.

Die Platten wurden vom Medium befreit und mit PBS gewaschen.

Mit jeder der angefertigten Proben wurden je zwei Wells mit je 250 µl beschickt, wobei für jedes Gingipain ein neuer Pipettenansatz verwendet wurde. Die Platten kamen für 90 min in den Brutschrank. Danach wurden jedem Well 250 µl entnommen und in Eppendorf-Tubes pipettiert. Diese wurden für 5 min bei 12.000 g zentrifugiert, 230 µl des Überstandes abgenommen und bei – 20°C eingefroren.

#### **Freisetzung des gesamten TGF β1 und aktiven TGF β1 nach Inhibition der Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* aus Gingivafibroblasten**

In einem weiteren Versuch wurden die Inhibitoren vorher den Bakteriensuspensionen zugesetzt, auf die Fibroblasten gebracht, die Überstände nach 1,5 und nach 6 h entnommen und mittels ELISA auf gesamtes TGF β1 und aktives TGF β1 untersucht.

##### *Versuchsdurchführung:*

Von der, wie oben angegeben, hergestellten Bakteriensuspension des Stammes *P. gingivalis* ATCC 33277 wurden zunächst je 1 ml in eines von vier Tubes gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µl Inhibitorlösung (Verhältnis 1:100). Die Inkubationszeit betrug 15 min. Dies wurde mit allen drei Inhibitoren durchgeführt.

Danach wurde ein Ansatz aus 350 µl dieser Bakteriensuspension und 3,15 ml DMEM hergestellt. Dies wurde auch mit den anderen beiden Bakterienstämmen *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 durchgeführt. Das Medium von insgesamt drei 24-Well-Platten (pro Stamm eine Platte) wurde mittels Vacusafe abgesaugt, die Platten einmal mit PBS gewaschen.

Von den angesetzten Bakteriensuspensionen wurden je 500 µl auf jedes Well gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 und 6 h wurden von jeder Platte je zwei Proben (a 500 µl) mit den verschiedenen Inhibitoren entnommen, in Eppendorf-Gefäße abgefüllt und 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Danach wurden von jeder Probe 350 µl abgenommen und eingefroren. Die Menge des gesamten und aktiven TGF β1 wurde mittels ELISA bestimmt.

### **mRNA-Analyse**

In der mRNA-Analyse sollten die Cysteinproteinasen HRgpA, RgpB, Kgp und der Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 sowie der mit FFrcK inhibierte *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 auf das Transkriptionsverhalten von TGF β1 untersucht werden.

Hierfür wurde eine 6-Well-Platte verwendet. Unter dem Mikroskop wurde zunächst die Monolayerschicht von Gingivafibroblasten der vorbereiteten 6-Well-Platte kontrolliert. Das Medium wurde abgesaugt und die Platte einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde in jedes Well 2 ml Medium pipettiert. Dieses Medium setzte sich zusammen aus 1800 µl DMEM und jeweils 200 µl Zusatz von

1. PBS - Kontrolle
2. 100 nM HRgpA (Endkonzentration 10 nM)
3. 100 nM RgpB (Endkonzentration 10 nM)
4. 100 nM KgP (Endkonzentration 10 nM)
5. *P. gingivalis* ATCC 33277
6. *P. gingivalis* ATCC 33277 + 50 nM FFrcK.

Die Gingipaine wurden zuvor aktiviert und der Inhibitor FFrcK 15 min zuvor der Bakteriensuspension zugesetzt. Die Infektion der Zellen wurde nach 1,5 h beendet, indem das Medium abgesaugt und die Platte zweimal mit 2 ml PBS und einmal mit 1 ml PBS gewaschen wurde. Zum Lösen der infizierten Zellen wurden 350 µl Trypsin/EDTA für 5-10 min in jedes Well gegeben. Dass sich die Zellen gelöst hatten, konnte daran erkannt werden, dass die Flüssigkeit trüb wurde. Zur Enzyminaktivierung wurde jedem Well 1 ml DMEM + FKS zugegeben und die

Suspension mehrmals mittels Pipette durchmischt. Die Suspension konnte nun abgesaugt und in Eppendorf-Gefäße pipettiert werden. Sie wurden 5 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand aspiriert und verworfen.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy-Kit (Qiagen®). Jede Probe wurde in 350 µl RLT-Puffer (10 µl β-Mercaptoethanol auf 1ml Puffer) gelöst, im Vortex für 1 min durchmischt und in einem doppelt sterilisierten Eppendorf-Gefäß bei -70°C tiefgefroren und gelagert.

Die Proben wurden aufgetaut und auf Eis weiterverarbeitet. Sie wurden im Vortex 30 s gemischt und danach mehrmals gewaschen: Den Proben wurde 350 µl 70%iges Ethanol zugegeben und durchmischt. Die Proben wurden in RNeasy-Säulchen gegeben, die in Eppendorf-Tubes steckten. Danach wurden die Röhrchen 15 s bei 12 000 g zentrifugiert, wobei die Proben durch die Säulchen gepresst wurden. Dabei blieb die mRNA im Säulchen, das aus Silikatgel besteht, hängen. Der Durchlauf in den Eppendorf-Tubes wurde verworfen. Die RNeasy-Säulen wurden in neue 2 ml Auffanggefäße gesteckt und 700 µl Waschpuffer RW1 auf die Säulchen gegeben. Eine erneute Zentrifugation für 15 s bei 12 000 g wurde vorgenommen, der Durchlauf und das Tube verworfen. Auf die Säulchen, die auf ein neues 2 ml Eppendorf-Tube kamen, wurde 500 µl RPE1-Puffer pipettiert. Alles wurde erneut für 15 s bei 12 000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde nochmals 500 µl RPE1-Puffer auf die Säulchen gegeben und für 2 min bei 12 000 g zentrifugiert. Die Säulchen kamen in neue 1,5 ml doppelt sterilisierte Eppendorf-Tubes und wurden mit 50 µl RNase-freiem Wasser 1 min bei 12 000 g gewaschen.

Die gereinigte RNA wurde bei -20 bis -70°C gelagert. Sie wurde zur weiteren Verarbeitung schonend auf Eis aufgetaut.

Da für die PCR jedoch DNA und keine RNA benötigt wurde, erfolgte eine Umschreibung mittels reverser Transkriptase, wobei die in der gesamten RNA enthaltene mRNA mittels Mastermix in cDNA umgeschrieben wurde.

Dazu wurde zunächst die RNA-Konzentration der Proben durch Extinktionsmessung mit einem Fotometer bestimmt. Es wurde mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die

Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen den Leerwert gemessen.  $OD_{260} = 1$  entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das Verhältnis gibt die Reinheit der RNA an und errechnet sich aus dem Quotienten der Extinktion 260nm/280 nm. Reine RNA hat einen Quotienten von 1,8 - 2,1. Zum Einsatz kam eine Konzentration von ca. 100 ng/µl RNA.

Bei den folgenden Schritten fand die Verarbeitung aller Reagenzien und RNA-Proben auf Eis statt, um einen Abbau zu verhindern.

Für die Reverse Transcriptase PCR wurde der Omniscript RT Kit der Firma Qiagen verwendet. Der Mastermix wurde hergestellt aus:

- 10x Puffer 12 µl
- dNTP-Mix 12 µl
- Oligo-dT primer (20 µM) 6 µl
- RNase inhibitor mix 6 µl
- Omniscript Rev. Transcr. 6 µl
- RNase-freies Wasser 66 µl

Dies ergab 108 µl Mastermix. 18 µl davon wurden mit 2 µl jeder Probe gereinigter RNA gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die entstandene cDNA konnte sofort für die PCR eingesetzt oder bei -70°C eingefroren werden.

### *Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Die PCR ist eine hochempfindliche *In vitro*-Methode zum Nachweis kleiner Mengen bestimmter Nucleinsäureabschnitte. Sie basiert auf der Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* gewonnen und deswegen auch *Taq*-Polymerase genannt wird. Sie ermöglicht es, viele PCR-Zyklen in Sequenz laufen zu lassen, da sie den Schritt der Denaturierung bei über 90°C unbeschadet übersteht, so dass nicht nach jedem Zyklus erneut Polymerase hinzugegeben werden muss. Es werden zwei Primeroligonukleotide verwendet, welche die zu untersuchende DNA-Sequenz flankieren.

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten:

1. Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf Temperaturen >90°C (90-99°C),



2. Anlagerung der Primer an die DNA durch Absenken der Temperatur (40-68°C),
3. Elongation des Komplementärstranges (72°C).

Durch jeden Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNA-Fragmente und somit zu einer annähernd exponentiellen Zunahme der von den Primern flankierten DNA-Sequenz. Die Anzahl der Zyklen kann vorher bestimmt werden und liegt in der Regel zwischen 20 und 40.

#### Real-time-PCR:

Es wurden für die PCR von TGF  $\beta$ 1 folgende Primer (NM 011577) verwendet:

fwd.: CAA TAC GTC AGA CAT TCG GG

rev.: TCC ACG TGG AGT TTG TTA TC

Als Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin (116):

fwd: CTT GGC AGC CTT CCT GAT TT

rev: GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA

Die Real-time-PCR erfolgte mittels Rotorgene 2000 (Corbett Research) mit folgenden Parametern: Denaturierung bei 94°C und 3 min, darauf folgend 40 Zyklen bei 94°C und 20 s, 55°C und 20 s, 72°C und 20 s. Zum Schluss wurde eine Schmelzkurve des Produktes von 50-99°C aufgenommen.

### 4. 3. Aktivierung von TGF $\beta$ 1

#### Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch *Porphyromonas gingivalis*

Bei diesem Versuch wurden die Überstände der Fibroblasten nach Beimpfung mit den Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 sowie *P. gingivalis* J374-1 und den mit den Inhibitoren versetzten Bakterienstämmen auf aktives TGF  $\beta$ 1 (ELISA) untersucht.

#### Versuchsdurchführung:

Die Fibroblasten einer Gewebekulturflasche wurden, wie zuvor beschrieben, gewonnen und mit 7,5 ml DMEM + FKS in Petrischalen kultiviert. Sie wurden für 48 h in den Brutschrank gegeben, damit die Zellen eine Monolayerschicht ausbilden konnten. Nach 48 h wurde das Medium mittels Pipette abgesaugt und durch 5 ml Medium ohne Serumzusatz ersetzt und für 30 h inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und 4 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen.

Die Inhibitoren wurden 15 min vor dem Versuch im Verhältnis 1:100 den Bakteriensuspensionen zugesetzt und bei 37 °C inkubiert. Eine Probe jedes Stammes wurde ohne Inhibitor angesetzt.

Es wurden zwei Kontrollansätze aus je 60 µl PBS und 540 µl dieses Überstandes hergestellt; dies entsprach einem Verhältnis von 1:9. Eine Kontrolle wurde für die Bestimmung des gesamten TGF β1 und eine für die Bestimmung des aktiven TGF β1 genutzt. Auch bei allen weiteren Proben wurde das Mischverhältnis 1:9 eingehalten und nach folgendem Schema pipettiert:

**Tabelle 1:** Pipettierschema für die Aktivierung von TGF β1 durch *P. gingivalis*

Überstand (9 Teile) + 1 Teil:		
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 ohne Inhibitor	<i>P. gingivalis</i> M5-1-2 ohne Inhibitor	<i>P. gingivalis</i> J374-1 ohne Inhibitor
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 + FFrcK	<i>P. gingivalis</i> M5-1-2 + FFrcK	<i>P. gingivalis</i> J374-1 + FFrcK
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 + Leupeptin	<i>P. gingivalis</i> M5-1-2 + Leupeptin	<i>P. gingivalis</i> J374-1 + Leupeptin
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 + TLCK	<i>P. gingivalis</i> M5-1-2 + TLCK	<i>P. gingivalis</i> J374-1 + TLCK

Die Inkubationszeit betrug 90 min bei 37 °C. Die Menge an aktivem TGF β1 wurde mittels ELISA bestimmt.

### **Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* (Gingipaine)**

Bei diesem Versuch wurden die Überstände der Fibroblasten nach Beimpfung mit den Gingipainen HRgpA, RgpB und Kgp auf aktives TGF  $\beta$ 1 (ELISA) untersucht.

#### ***Versuchsdurchführung:***

Die Zellkulturüberstände wurden, wie zuvor beschrieben, gewonnen.

Ein Ansatz wurde mit den Gingipainen hergestellt. Mit jedem der zuvor aktivierten Gingipaine wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Die Molarität der Gingipaine wurde so mit DMEM verdünnt, dass sie in den jeweiligen Endkonzentrationen von 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zur Verfügung standen. Diese Gingipaine in den fünf verschiedenen Molaritäten wurden ebenfalls im Verhältnis 1:9 mit den Zellkulturüberständen nach folgendem Schema gemischt:

**Tabelle 2:** Pipettierschema für die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 durch die Gingipaine

Überstand (9 Teile) + 1Teil:		
HRgpA 0,01 nM	RgpB 0,01 nM	Kgp 0,01 nM
HRgpA 0,1 nM	RgpB 0,1 nM	Kgp 0,1 nM
HRgpA 1 nM	RgpB 1 nM	Kgp 1 nM
HRgpA 10 nM	RgpB 10 nM	Kgp 10 nM
HRgpA 100 nM	RgpB 100 nM	Kgp 100 nM

Es wurden zwei Kontrollansätze aus je 60  $\mu$ l PBS und 540  $\mu$ l dieses Überstandes hergestellt. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:9. Eine Kontrolle wurde für die Bestimmung des gesamten TGF  $\beta$ 1 und eine für die Bestimmung des aktiven TGF  $\beta$ 1 genutzt. Die Inkubationszeit betrug 90 min bei 37 °C. Die Menge an aktivem TGF  $\beta$ 1 wurde mittels ELISA bestimmt.

## **Western Blot-Analyse**

In der Western Blot-Analyse sollte der Abbau von TGF  $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen HRgpA, RgpB, Kgp sowie durch den Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und den mit FFrcK inhibierten *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 untersucht werden.

TGF  $\beta$ 1 (rekombinantes aktives TGF  $\beta$ 1, Biosource Carlsbad Kalifornien) wurde im Verhältnis 1:9 (100 $\mu$ l + 900  $\mu$ l) gemischt mit

1. PBS - Kontrolle
2. 100 nM HRgpA (Endkonzentration 10 nM)
3. 100 nM RgpB (Endkonzentration 10 nM)
4. 100 nM Kgp (Endkonzentration 10 nM)
5. *P. gingivalis* ATCC 33277
6. *P. gingivalis* ATCC 33277 + 50 nM FFrcK (FFrcK wurde 15 min zuvor der Bakteriensuspension zugesetzt.)

Die Inkubationszeit betrug 90 min.

Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Zuvor werden die Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichtes über Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die nun im Gel vorhandenen Proteine werden auf eine Membran (oft Nitrocellulose) transferiert. Nach dem Blotting können die transferierten Proteine über Antikörperdetektion nachgewiesen werden. Der Nachweis der Proteine erfolgt durch spezifische Erstantikörper, und anschließend über Zweitantikörper, die an ein Enzym ( oft Peroxidase) gekoppelt sind.

### *Trennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)*

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) dient dazu, Proteine aus einem Gemisch nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, um die Größe eines Proteins zu bestimmen oder um die Reinheit eines Proteins zu überprüfen. Die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen in einer Polyacrylamid-Gelmatrix ist von ihrer Größe und Form abhängig und wird durch die Nettoladung des Proteins bestimmt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat

(SDS) wird von Proteinen quantitativ gebunden und bewirkt in Gegenwart von Thiolreagenzien, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol, eine zumeist vollständige Denaturierung der Proteine. Die Sulfatgruppen des SDS verleihen den Proteinen eine stark negative Gesamtladung, die der Masse des jeweiligen komplexierten Proteins proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in der SDS-PAGE wird so hauptsächlich durch den Siebeffekt der Gelmatrix und die angelegte Stromstärke bestimmt und korreliert sehr gut mit dem Molekulargewicht der Proteine. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Mini-Gel-Apparatur. Nach dem Zusammenbau der Gelplatten mit Spacer in der Apparatur wurde zunächst das Trenngel gegossen, dann das Sammelgel gegossen und der Kamm eingesetzt.

Die Apparatur wurde anschließend mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Pro Bahn wurden 30  $\mu$ l der Proben mit 30  $\mu$ l Probenpuffer gemischt, 5 min bei 99°C erhitzt, dann kurz zentrifugiert und in die Starttaschen des Gels gefüllt. Parallel dazu wurden 5  $\mu$ l Marker aufgetragen. Die Elektrophorese lief unter folgenden Parametern: 30 V Sammelgel, 80 V Trenngel. (Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist dem Anhang zu entnehmen.)

#### *Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membran*

Nach der Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese erfolgt die Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran durch elektrophoretisches Blotting. Die Nitrocellulose-Membran wurde 5 min in 30% Methanol gegeben und anschließend für mindestens 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wurde nach dem Ende der Elektrophorese ebenfalls für 5 min in Transferpuffer gelegt und somit gewaschen. Es wurden drei Filterpapiere auf Gelgröße zurechtgeschnitten, in Transferpuffer getränkt und aufeinander gelegt. Darauf wurde dann das Gel platziert und auf dem Gel wiederum die Nitrocellulose-Membran. Der Blotaufbau wurde vervollständigt, indem wieder drei Filterpapiere in Transferpuffer getränkt und oben auf die Nitrocellulose-Membran gelegt wurden (Sandwich-Prinzip). Es wurde mit 30 V über Nacht bei 4°C geblottet.

### *Proteinnachweis durch Antikörper*

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran aus der Blotting-Kassette genommen, in eine geeignete Schale gelegt und für 2-5 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Anschließend wurde sie mit Aqua dest. entfärbt, um die Proteinproben sichtbar zu machen. Dann wurde die Membran für 2-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in 1% BSA/TBST inkubiert. Auf diese Weise wurden die freien Bindungsstellen an der Nitrocellulose-Membran blockiert und eine unspezifische Bindung des zur Detektion verwendeten Antikörpers verhindert. Nach Entfernung der Lösung nach vorgegebener Zeit erfolgte die Inkubation mit dem ersten proteinspezifischen Antikörper TGF  $\beta$ 1 (1:1000, BioSource) über Nacht. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Membran mit TBST gewaschen, beim ersten Mal kurz, dann dreimal für je 15 min bei Raumtemperatur.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper Anti-Mouse (1:10 000, Sigma) für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Danach wurde die Membran, wie oben angegeben, gewaschen und mit ECL-Lösung (nach Angaben des Herstellers Amersham) benetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem Kodak X-OMAT-Film (Kodak).

## **4. 4. Bestimmung von TGF $\beta$ 1 mittels ELISA**

Der Nachweis von TGF  $\beta$ 1 erfolgte nach dem ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*)-Verfahren, einem sog. Sandwich-Enzym-Immunoassay. Es wurden die Human TGF- $\beta$ 1 CytoSets<sup>TM</sup> (BioSource-Invitrogen) verwendet.

Die Versuche wurden mit zwei ELISA-Platten durchgeführt. Diese wurden am Tag zuvor einmal mit PBS gewaschen und auf jedes Well wurden 100  $\mu$ l Coating Antikörperlösung (10  $\mu$ l Coating Antikörper zu 9,990 ml PBS) gebracht. Die Platten wurden über Nacht (12 - 18 h) bei 2-8°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die ELISA-Platten auf adsorbierendem Papier vorsichtig abgeklopft. Anschließend wurde 200 µl Blockinglösung, bestehend aus PBS und 4% bovinem Serumalbumin, in jedes Well pipettiert.

Die Platten wurden abgedeckt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurde die Blockinglösung ebenso auf einem adsorbierendem Papier abgeklopft, und die Platten wurden dreimal gewaschen, zweimal jedes Well mit 200 µl und einmal jedes Well mit 400 µl Waschlösung (9,0 g NaCl, 1ml Tween 20 auf 1000 ml, pH 7,4).

Es wurden Standards in den Endkonzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,675 und 0 pg/ml hergestellt. Dazu wurden 12 ng des TGF β1-Standards in 3 ml Aqua dest. gelöst; dies entsprach einer Konzentration von 4000 pg/ml. Für die Verdünnungsreihe wurden acht Eppendorf-Tubes mit den jeweiligen Konzentrationen beschriftet und in das erste 450 µl und jedes weitere 250 µl Probenpuffer (PBS mit 0,5% bovinem Serumalbumin + 1 ml Tween 20 per 1l) pipettiert. Dem TGF β1-Standard in der Konzentration 4000 pg/ml wurden 50 µl entnommen und in das erste Eppendorf-Tube pipettiert, so erhielt man die Konzentration von 1000 pg/ml. Diesem Tube wurden 250 µl entnommen und in das nächste Eppendorf-Tube pipettiert, um die Konzentration von 500 pg/ml zu erhalten. So wurde fortgefahren, um die weiteren Verdünnungen in den o. g. Endkonzentrationen zu erzielen.

Die Eppendorf-Gefäße wurden wie die ELISA-Platten beschriftet, sodass die Proben sicher zugeordnet werden konnten. Um das gesamte TGF β1 der Proben zu ermitteln, wurden 25 µl jeder Probe mit 100 µl Probenpuffer in die Eppendorf-Gefäße pipettiert und durchmischt. Sie wurden anschließend bei 99°C 1 min lang im Thermomixer erhitzt.

Danach wurden alle Proben auf die ELISA-Platten gebracht und 50 µl Detektionsantikörperlösung (5 µl biotinylierter Detektionsantikörper auf 4,995 ml Probenpuffer) dazugegeben. Die Platten wurden dann abgedeckt für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Lösung wurde nachfolgend entfernt und die Platten erneut, wie bereits zuvor beschrieben, gewaschen. Danach wurden 100 µl Streptavidinlösung in jedes Well pipettiert, die Platten abgedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde wiederum die Lösung entfernt und die Platten wurden mit TBS Tween dreimal gewaschen.

Anschließend wurden in jedes Well 100 µl Substrat TMB gegeben. Danach wurden die Platten ohne Abdeckung im Dunklen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Erfolgte eine Blaufärbung der Proben, wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung (0,5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) angehalten - die Proben erhielten so eine gelbe Farbe. Die Intensität wurde mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen und mit dem Programm Easy FIT anhand des mitgeführten Standards berechnet.



## 5. Ergebnisse

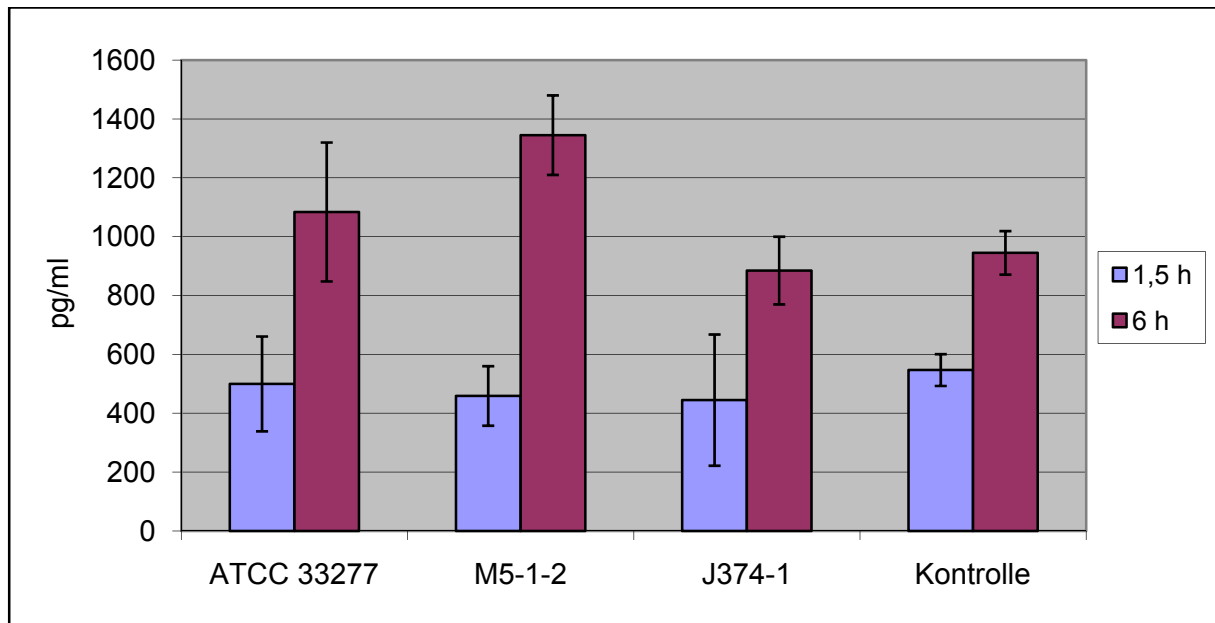
Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte ( $\pm$ SD) aus mindestens 3 Versuchen und in den Tabellen 3 bis 11 im Anhang zusammenfassend aufgeführt.

### 5. 1. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Freisetzung des gesamten und aktiven TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach Infektion mit den *P. gingivalis*-Stämmen, seinen Cysteinproteinasen und den mit Inhibitoren versetzten *P. gingivalis*-Stämmen erläutert. Die mRNA-Analyse zeigt die Transkription von TGF  $\beta$ 1-mRNA aus Gingivafibroblasten nach Behandlung mit den Cysteinproteinasen, dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und dem mit FFrcK inhibierten *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277.

#### 5. 1. 1. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 durch *Porphyromonas gingivalis* aus Gingivafibroblasten

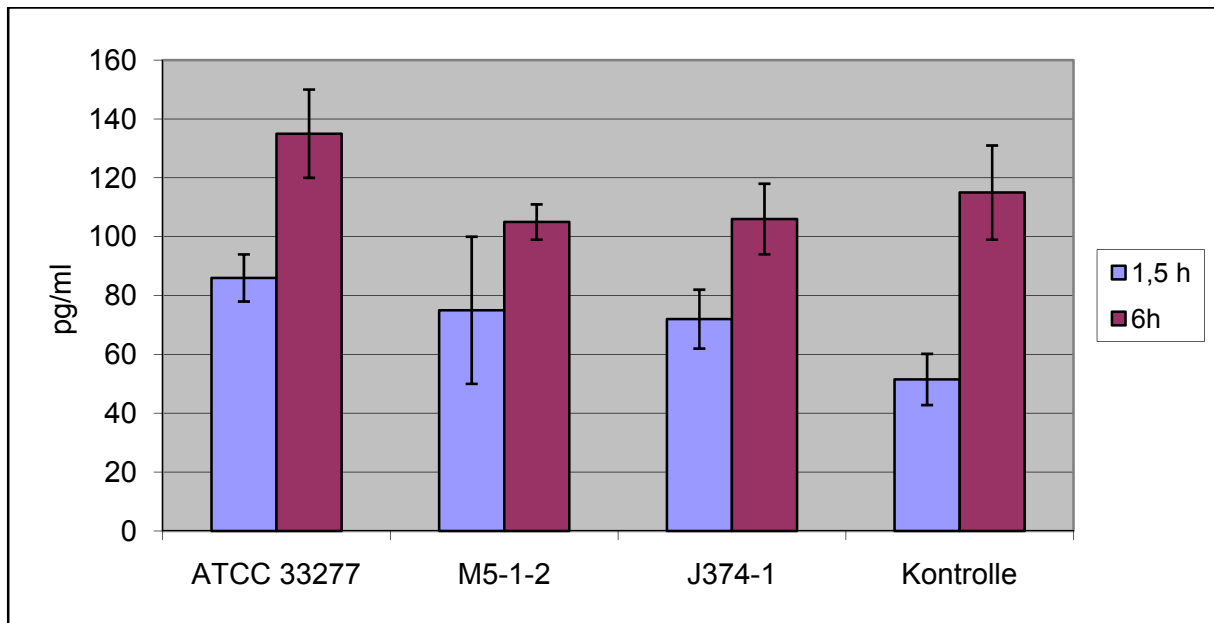
Die nach 1,5 und nach 6 h entnommenen Überstände wurden mittels ELISA auf das gesamte TGF  $\beta$ 1 und auf aktives TGF  $\beta$ 1 untersucht.



**Abbildung 2: Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1** aus den mit den Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h (Tabelle 3 im Anhang)

Bei nicht infizierten Fibroblasten wurden 547 ( $\pm$ 54) pg/ml gesamtes TGF  $\beta$ 1 gemessen. Nach 6 h hatte sich der Wert des gesamten TGF  $\beta$ 1 bei den nicht infizierten Gingivafibroblasten fast verdoppelt; er betrug 945 ( $\pm$  74) pg/ml.

Bei den mit den Bakterienstämmen infizierten Gingivafibroblasten zeigten sich nach 1,5 h keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle. Die Menge des gesamten TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der infizierten Gingivafibroblasten lag zwischen 445 pg/ml und 500 pg/ml. Nach 6 h hatte sich das gesamte TGF  $\beta$ 1 bei den mit dem Referenzstamm infizierten Zellen sowie auch bei den mit dem Stamm *P. gingivalis* J374-1 infizierten Fibroblasten in etwa verdoppelt. Nur der Wert des gesamten TGF  $\beta$ 1 der mit *P. gingivalis* M5-1-2 infizierten Fibroblasten zeigte einen Anstieg auf etwa das Dreifache und betrug 1345 ( $\pm$  135) pg/ml (Abb. 2).



**Abbildung 3: Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1** aus den mit den Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h (Tabelle 4 im Anhang)

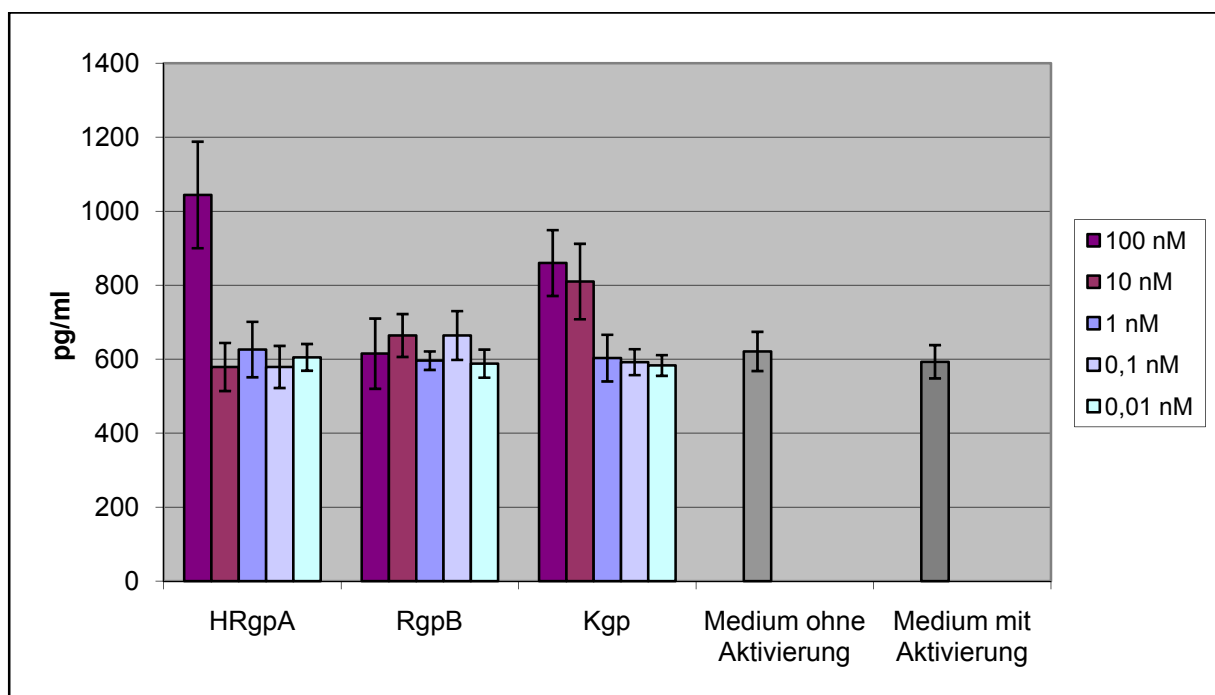
Bei der Untersuchung auf aktives TGF  $\beta$ 1 wurde bei den nicht infizierten Fibroblasten nach 1,5 h ein Wert von 52 ( $\pm$  9) pg/ml gemessen. Die Werte des aktiven TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der mit den drei Bakterienstämmen infizierten Fibroblasten waren nach 1,5 h verglichen zum Kontrollwert erhöht; sie lagen zwischen 72 pg/ml und 86 pg/ml.

Nach 6 h war wiederum ein Anstieg des aktiven TGF  $\beta$ 1 in den nicht infizierten Zellen auf 115 ( $\pm$  16) pg/ml zu verzeichnen. Auch hier verhielt es sich bei den infizierten Zellen ähnlich wie bei den nichtinfizierten, wobei sich unter den drei Bakterienstämmen geringe Abweichungen abzeichneten. So war der Spiegel mit 135 ( $\pm$  15) pg/ml an aktivem TGF  $\beta$ 1 nach Infektion der Fibroblasten mit dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 höher als die Werte an aktivem TGF  $\beta$ 1 der Fibroblasten, die mit den beiden anderen Stämmen infiziert wurden (Abb. 3).

### 5. 1. 2. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* (Gingipaine) aus Gingivafibroblasten

Die mit den Gingipainen HRgpA, RgpB und Kgp infizierten Gingivafibroblasten wurden nach 90 min auf Freigabe des gesamten TGF  $\beta$ 1 und aktiven TGF  $\beta$ 1 untersucht. Dabei wurden die Gingipaine in fünf Konzentrationen verwendet: 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM.

#### Gesamtes TGF $\beta$ 1



**Abbildung 4: Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1** nach Zugabe der Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM zu den Gingivafibroblasten und einer Inkubationszeit von 90 min (Tabelle 5 im Anhang)

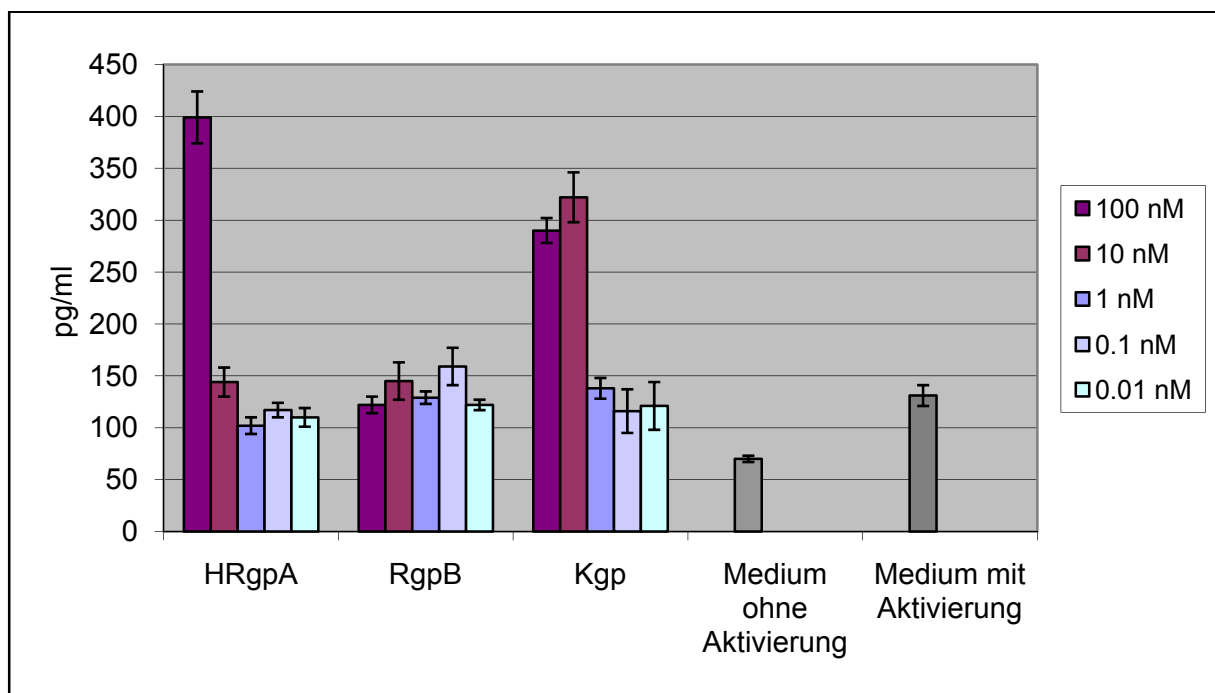
Die Kontrollwerte nach Zugabe von Aktivierungspuffer und Medium bzw. PBS und Medium betrugen ca. 600 pg/ml; ein deutlicher Einfluss des Aktivierungspuffers bestand nicht.

Die Werte des TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der mit RgpB infizierten Zellen zeigten keine deutlichen Unterschiede zu den Werten der beiden Kontrollen. Der Spiegel an gesamtem TGF  $\beta$ 1 war aber höher nach Zugabe von 100 nM HRgpA bzw. 10 und

100 nM Kgp. So wurde bei Zusatz der höchsten Konzentration von 100 nM HRgpA in den Überständen der Zellen fast doppelt so viel TGF  $\beta$ 1 gefunden als in den anderen Konzentrationen; der Wert betrug 1044 ( $\pm$  144) pg/ml. Die Werte des gesamten TGF  $\beta$ 1 nach Zugabe des Gingipains Kgp betrugen 810 ( $\pm$  102) pg/ml (10 nM) bzw. 860 ( $\pm$  89) pg/ml (100nM).

Die Werte von TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der mit niedrigeren Konzentrationen von HRgpA und Kgp stimulierten Zellen zeigten keine deutlichen Differenzen zu den Werten der beiden Kontrollen (Abb. 4).

### Aktives TGF $\beta$ 1



**Abbildung 5: Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1** nach Zugabe der Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM zu den Gingivafibroblasten und einer Inkubationszeit von 90 min (Tabelle 6 im Anhang)

Der Kontrollwert mit PBS und Medium, also ohne Aktivierung, betrug 70 ( $\pm$  3) pg/ml. Die Kontrolle mit Aktivierungspuffer wies 131 ( $\pm$  10) pg/ml aktives TGF  $\beta$ 1 aus.

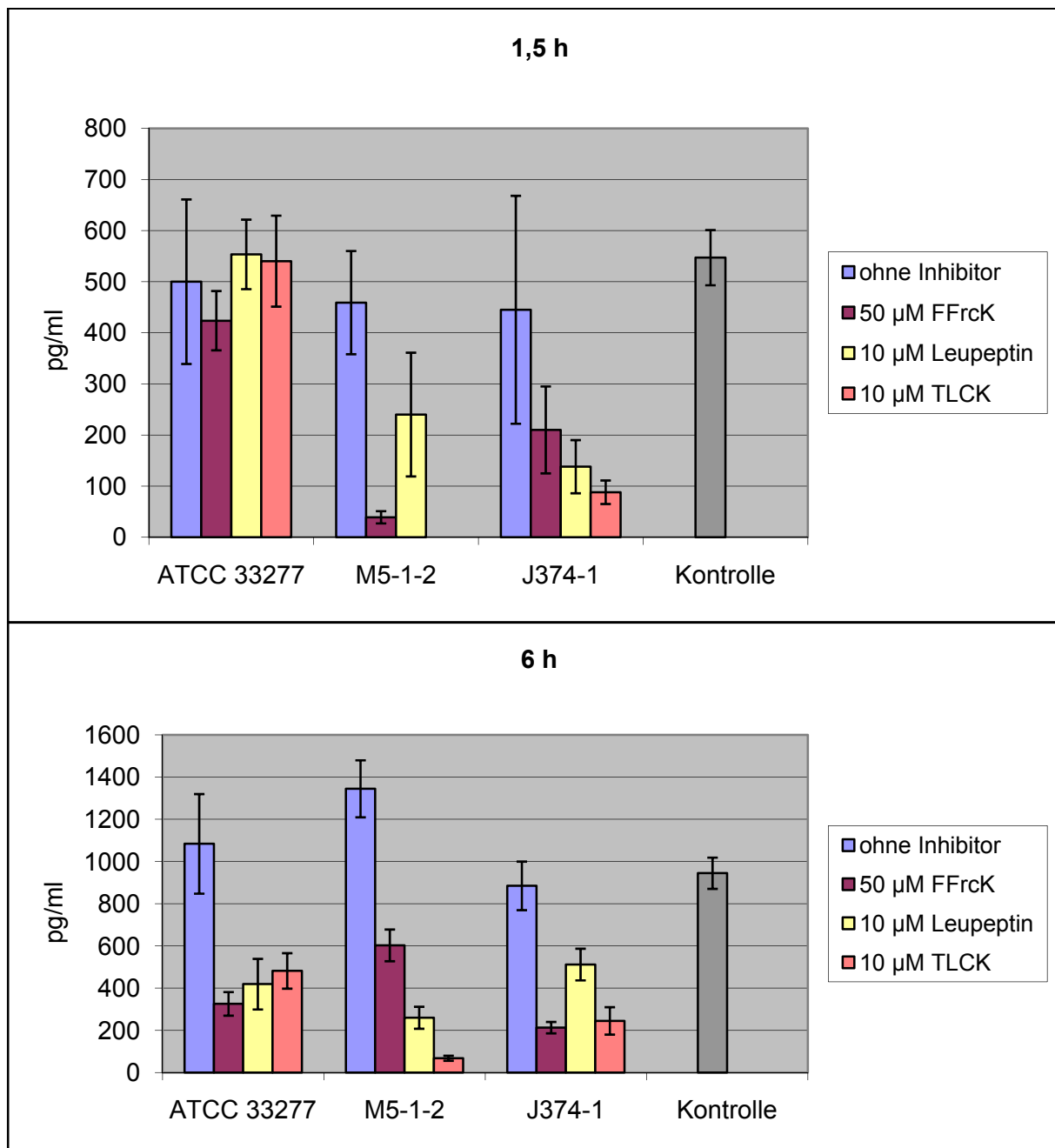
Die Werte des aktiven TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der mit RgpB infizierten Zellen zeigten keine deutlichen Unterschiede zum Wert der Kontrolle mit Aktivierungspuffer. Die Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1 war aber auch hier deutlich gesteigert bei den

mit den höher konzentrierten Proteinasen von HRgpA und KgP versetzten Fibroblasten. In der höchsten Konzentration von 100 nM wurde in den Überständen der Zellen, die mit HRgpA versetzt waren, etwa dreimal so viel TGF  $\beta$ 1 - verglichen mit den anderen Konzentrationen - gefunden. Der Wert betrug 399 ( $\pm$  25) pg/ml.

Auch die Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1 war durch das Gingipain Kgp in den beiden Konzentrationen von 100 nM und 10 nM deutlich gesteigert. Das aktive TGF  $\beta$ 1 war etwa doppelt so hoch - verglichen mit den Werten der anderen Konzentrationen und auch der Kontrolle mit Aktivierungspuffer. Nach Zugabe von niedrigeren Konzentrationen von HRgpA und Kgp konnte kein Einfluss auf den Spiegel an aktivem TGF  $\beta$ 1 festgestellt werden (Abb. 5).

### **5. 1. 3. Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 und aktiven TGF $\beta$ 1 nach Inhibition der Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* aus Gingivafibroblasten**

Die Inhibitoren FFrck, Leupeptin und TLCK wurden jedem Stamm zugesetzt, die Fibroblasten damit beimpft und die Überstände nach 1,5 und nach 6 h auf das gesamte TGF  $\beta$ 1 und auf aktives TGF  $\beta$ 1 untersucht. Der Inhibitor FFrck hemmt die lysin- und argininspezifische Cysteinproteinaseaktivität, während die Inhibitoren Leupeptin und TLCK auf eine Cysteinproteinase spezialisiert sind. Leupeptin hemmt die argininspezifische Cysteinproteinaseaktivität und TLCK die lysinspezifische.

Gesamtes TGF  $\beta$ 1

**Abbildung 6: Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1** aus den mit den Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach Zugabe der Inhibitoren FFrck, Leupeptin und TLCK nach 1,5 und 6 h (Tabelle 7 im Anhang)

Die Zugabe der Inhibitoren FFrck, Leupeptin und TLCK hemmte bei allen geprüften Bakterienstämmen die Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1 aus den Gingivafibroblasten.

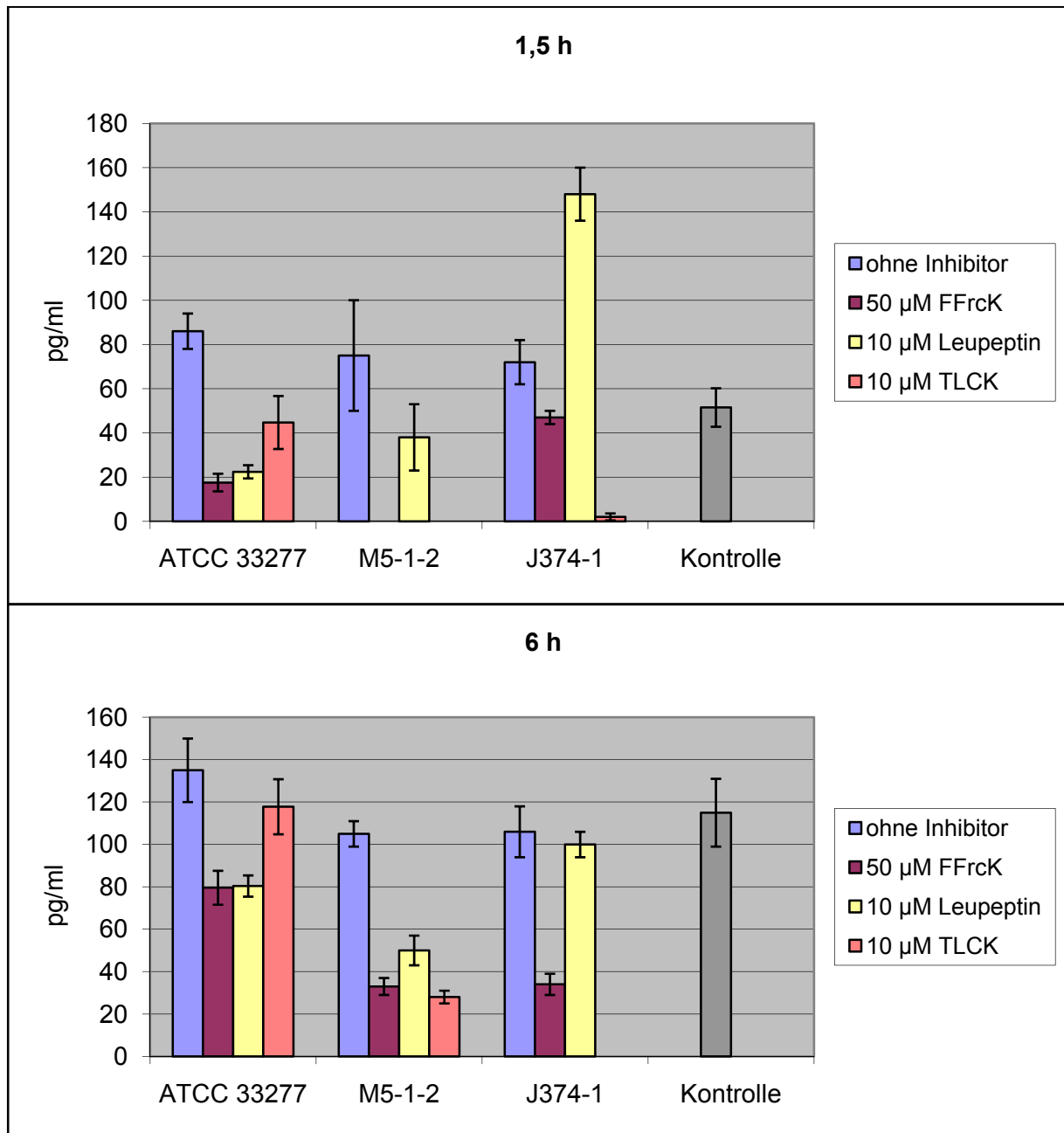
Der Zeitpunkt der stärksten Hemmung war jedoch bei den Stämmen etwas verschieden. Während bei den mit dem *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 infizierten Gingivafibroblasten nach 1,5 h noch keine Hemmung der Freisetzung von TGF  $\beta$ 1 zu verzeichnen war, konnte bei den beiden klinischen Isolaten *P. gingivalis* M5-1-2 und J374-1 bereits zu diesem Zeitpunkt ein Hemmeffekt gemessen werden. Nach 6 h zeigten alle Inhibitoren bei allen drei Bakterienstämmen ihre Wirkung auf die Freigabe von TGF  $\beta$ 1.

Bei den mit dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Zellen zeigte der Inhibitor FFrcK, der beide Cysteinproteinasen hemmt, die größte Wirkung auf die Freisetzung von TGF  $\beta$ 1. Das TGF  $\beta$ 1 konnte auf etwa ein Drittel reduziert werden.

Bei den mit dem Bakterienstamm *P. gingivalis* M5-1-2 infizierten Zellen war der Inhibitor TLCK, der die lysinspezifische Cysteinproteinasenaktivität hemmt, effektiver. Nach 1,5 h war die Freisetzung vollständig inhibiert, es konnte kein TGF  $\beta$ 1 in dieser Probe gemessen werden. Nach 6 h wurden nur 68 ( $\pm$  12) pg/ml mit Inhibitor, verglichen zu 1345 ( $\pm$  135) pg/ml ohne Inhibitorzusatz, gemessen. Auch FFrcK hemmte die Freisetzung bei den mit *P. gingivalis* M5-1-2 infizierten Zellen deutlich - verglichen mit den infizierten Zellen ohne Inhibitor. Das TGF  $\beta$ 1 war nach 1,5 h von 459 ( $\pm$  101) pg/ml auf 39 ( $\pm$  12) pg/ml gesunken.

Bei den mit dem klinischen Isolat *P. gingivalis* J374-1 infizierten Zellen zeigten auch die Inhibitoren FFrcK und TLCK die stärkste Wirkung auf die Freisetzung von TGF  $\beta$ 1. Nach 1,5 h hemmte TLCK die Freisetzung am deutlichsten. Das TGF  $\beta$ 1 war von 445 ( $\pm$  223) pg/ml auf etwa ein Fünftel gesunken, es betrug nur noch 88 ( $\pm$  23) pg/ml. Nach 6 h hatte FFrcK die größte Wirkung auf die Senkung des TGF  $\beta$ 1. Der Wert sank von 885 ( $\pm$  115) pg/ml auf etwa ein Viertel, er betrug 213 ( $\pm$  27) pg/ml (Abb. 6).



Aktives TGF  $\beta$ 1

**Abbildung 7: Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1** aus den mit den Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach Zugabe der Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK nach 1,5 und 6 h (Tabelle 8 im Anhang)

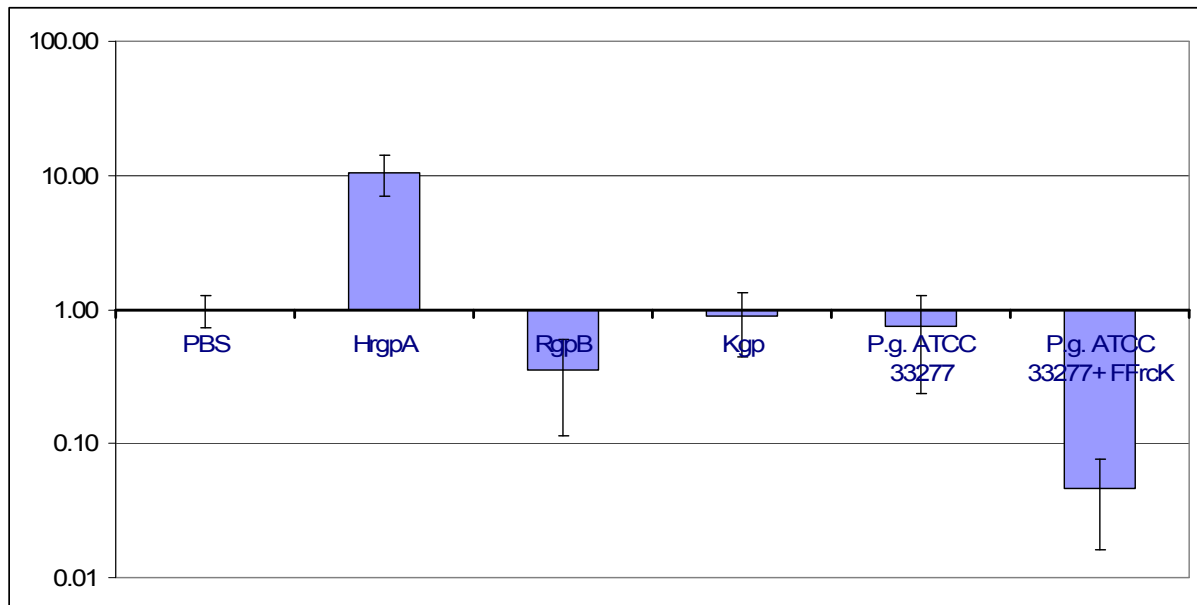
Nach Zugabe der Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK war die Freigabe des aktiven TGF  $\beta$ 1, verglichen mit den infizierten Zellen ohne Inhibitor, gehemmt. Eine Ausnahme bildete Leupeptin bei den mit dem Bakterienstamm *P. gingivalis* J374-1 infizierten Gingivafibroblasten; es hatte keinen Effekt auf die Hemmung der Freisetzung.

Bei den mit dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Zellen war die Hemmung durch alle drei Inhibitoren nach 1,5 h stärker als nach 6 h, wobei der Inhibitor FFrcK den größten Einfluss zeigte. Er verursachte eine Abnahme des aktiven TGF  $\beta$ 1 von 86 ( $\pm$  8) pg/ml auf 18 ( $\pm$  4) pg/ml. Nach 6 h zeigte der Inhibitor TLCK keinen Effekt mehr auf die mit *P. gingivalis* ATCC 33277 infizierten Fibroblasten.

Bei den mit dem klinischen Isolat *P. gingivalis* M5-1-2 infizierten Zellen zeigten die Inhibitoren FFrcK und TLCK die stärkste Wirkung. Nach 1,5 h wurde in den Überständen kein aktives TGF  $\beta$ 1 mehr gefunden. Auch nach 6 h war das aktive TGF  $\beta$ 1 von 105 ( $\pm$  6) pg/ml ohne Inhibition auf 33 ( $\pm$  4) pg/ml nach Hemmung mit FFrcK und auf 28 ( $\pm$  3) pg/ml nach Inhibition durch TLCK gesunken.

Bei den mit dem Stamm *P. gingivalis* J374-1 infizierten Fibroblasten war die Hemmung durch den Inhibitor TLCK am deutlichsten, während der Inhibitor Leupeptin keinen Effekt zeigte. Durch TLCK sank das aktive TGF  $\beta$ 1 nach 1,5 h von 72 ( $\pm$  10) pg/ml ohne Inhibition auf nur 2 ( $\pm$  1,6) pg/ml. Nach 6 h hemmte dieser Inhibitor die Freisetzung vollständig, es konnte kein aktives TGF  $\beta$ 1 mehr gemessen werden. Der Inhibitor FFrcK zeigte nach 6 h eine stärkere Wirkung als nach 1,5 h. Das aktive TGF  $\beta$ 1 war dann auf ca. ein Drittel des Wertes ohne Inhibitor gesunken: auf 34 ( $\pm$  5) pg/ml (Abb. 7).

#### 5. 1. 4. Ergebnisse für die mRNA-Analyse



**Abbildung 8: mRNA-Analyse** von TGF β1-mRNA aus Gingivafibroblasten nach Behandlung mit den Gingipainen in der Konzentration von 100 nM, dem Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und dem mit FFrcK (50nM) inhibierten Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277. Die Menge der TGF β1-mRNA in der Kontrolle (PBS) wurde auf 1 gesetzt. (Tabelle 9 im Anhang)

Es wurden 6 Proben mit den Gingivafibroblasten versetzt und nach einer Inkubationszeit von 90 min die mRNA für TGF β1 aus den Gingivafibroblasten extrahiert. Die erste Probe enthielt PBS und diente als Kontrolle.

Dann wurden die drei Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Endkonzentrationen von 10 nM auf die Expression von TGF β1-mRNA untersucht. Dabei zeigte sich eine mehr als zehnmals so hohe Transkription von TGF β1-mRNA nach Stimulierung durch die Cysteinproteinase HRgpA im Vergleich zur Kontrolle. RgpB hingegen hemmte die Transkription der TGF β1-mRNA. Es wurden nur 36% an TGF β1-mRNA im Vergleich zum Kontrollwert gefunden. Kgp hatte kaum Auswirkungen auf die Transkription von TGF β1-mRNA. Der Wert lag geringfügig unter dem der Kontrolle.

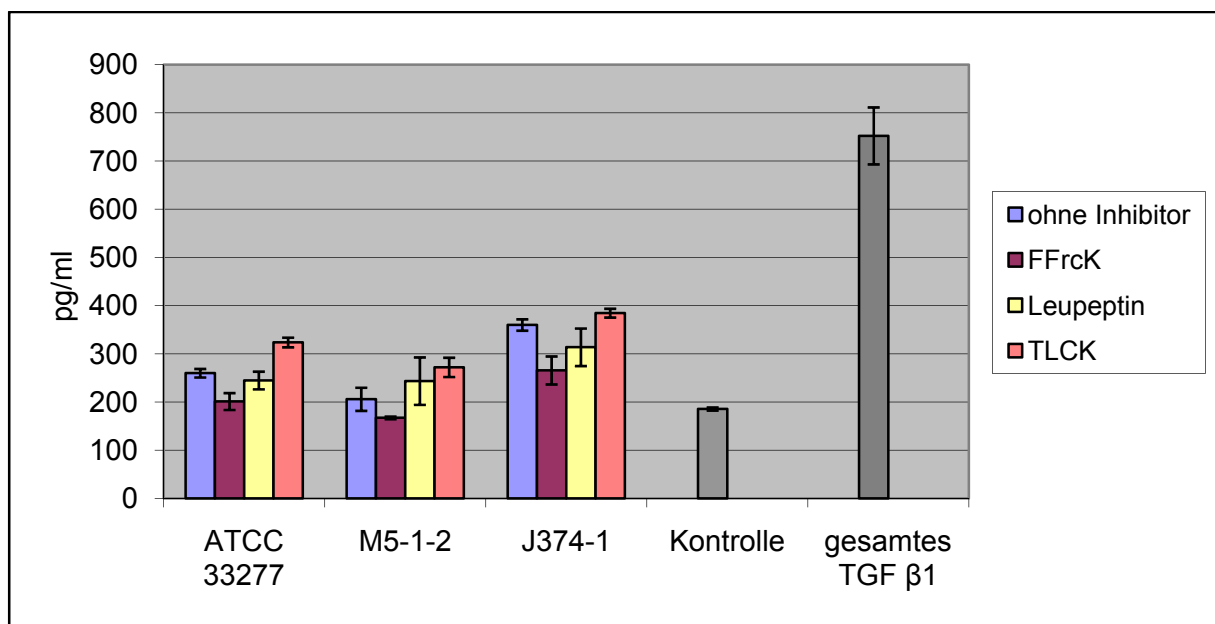
Weiterhin wurde der Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 auf das Transkriptionsverhalten von TGF β1 untersucht. Es wurden 74% an TGF β1-mRNA exprimiert - verglichen mit der Kontrolle. Zusätzlich wurde in einer weiteren Probe der Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 mit dem Inhibitor FFrcK versetzt, bevor

die Gingivafibroblasten mit ihm infiziert wurden. Dies führte dazu, dass es durch den inhibierten *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 zu einer stark verminderten Transkription von TGF  $\beta$ 1-mRNA kam. Es wurden nur 5% des Kontrollwertes an TGF  $\beta$ 1-mRNA gefunden (Abb. 8).

## 5. 2. Aktivierung von TGF $\beta$ 1

Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der Gingivafibroblasten nach Behandlung mit den *P. gingivalis*-Stämmen, seinen Cysteinproteinasen und den mit Inhibitoren versetzten *P. gingivalis*-Stämmen erläutert. Die Western Blot-Analyse zeigt den Abbau des aktiven TGF  $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von *P. gingivalis* und dem Referenzstamm *P. gingivalis* ATCC 33277.

### 5. 2. 1. Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch *Porphyromonas gingivalis*



**Abbildung 9: Aktivierung von TGF  $\beta$ 1** durch die Bakterienstämme *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 und Beeinflussung der Aktivierung durch Zugabe der Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK zu den Bakterienstämmen vor der Infektion (Tabelle 10 im Anhang)

In Abbildung 9 werden zum einen die Resultate für die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 durch die Bakterienstämme *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 dargestellt und zum anderen die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 aufgezeigt, nachdem die Bakterienstämme vor der Infektion mit den Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK behandelt wurden.

Alle drei Bakterienstämme führten zu einer Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 - verglichen zur Kontrolle. In der Kontrolle, in der sich weder Bakterien noch Inhibitoren befanden, wurden 186 ( $\pm$  3) pg/ml aktives TGF  $\beta$ 1 gefunden. Die Aktivierung war bei dem Bakterienstamm *P. gingivalis* M5-1-2 am geringsten; der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 betrug 206 ( $\pm$  24) pg/ml. Bei dem Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 war die Aktivierung deutlicher, der Wert betrug 260 ( $\pm$  9) pg/ml, und beim Bakterienstamm *P. gingivalis* J374-1 sehr ausgeprägt, der Wert betrug 360 ( $\pm$  12) pg/ml.

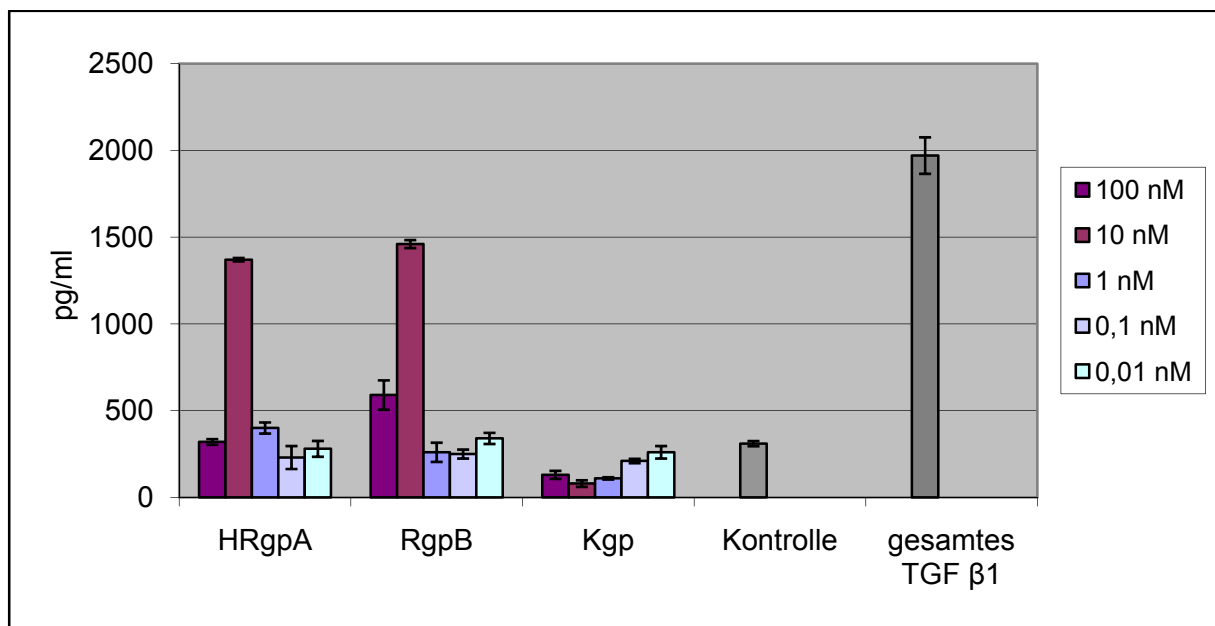
Nach Zugabe der Inhibitoren zeigten die Bakterienstämme untereinander kaum Veränderungen. Verglichen mit den Stämmen ohne Inhibitor war die Hemmung der Aktivierung am deutlichsten durch Zugabe des Inhibitors FFrcK, der beide Cysteinproteinasen von *P. gingivalis* hemmt. Allerdings war die Reduktion des aktiven TGF  $\beta$ 1 durch FFrcK relativ gering.

Leupeptin hemmt die argininspezifischen Cysteinproteinasen - also die Gingipaine HRgpA und RgpB. Durch Zugabe dieses Inhibitors fand bei dem Stamm *P. gingivalis* M5-1-2 keine Hemmung der Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 statt. Der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 war, verglichen mit dem Bakterienstamm ohne Inhibitor, sogar erhöht; er betrug 244 ( $\pm$  49) pg/ml. Die Hemmung der Aktivierung bei den anderen beiden Stämmen *P. gingivalis* ATCC 33277 und *P. gingivalis* J374-1 fiel sehr gering aus. Verglichen mit den Werten des aktiven TGF  $\beta$ 1 ihres Stammes ohne Leupeptin waren ihre Werte nur wenig geringer; der Wert des Stammes *P. gingivalis* ATCC 33277 betrug 245 ( $\pm$  18) pg/ml und der des Stammes *P. gingivalis* J374-1 314 ( $\pm$  39) pg/ml.

TLCK hemmt nur die lysinspezifischen Cysteinproteinasen, also das Gingipain Kgp. Durch Zugabe von TLCK fand keine Hemmung der Aktivierung von aktivem TGF  $\beta$ 1 statt; darüberhinaus hatte sich das aktive TGF  $\beta$ 1 bei allen drei Bakterienstämmen

sogar noch erhöht - verglichen mit den Werten der Stämme ohne Inhibitor. Durch den Inhibitor TLCK erfolgte also eine weitere Steigerung der Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 (Abb. 9).

### 5. 2. 2. Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch die Cysteinproteinasen von *Porphyromonas gingivalis* (Gingipaine)



**Abbildung 10: Aktivierung von TGF  $\beta$ 1** durch die Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM (Tabelle 11 im Anhang)

Die Untersuchung der einzelnen Cysteinproteinasen auf Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 erzielte folgende Ergebnisse:

In der Kontrolle befanden sich 310 ( $\pm$  15) pg/ml aktives TGF  $\beta$ 1.

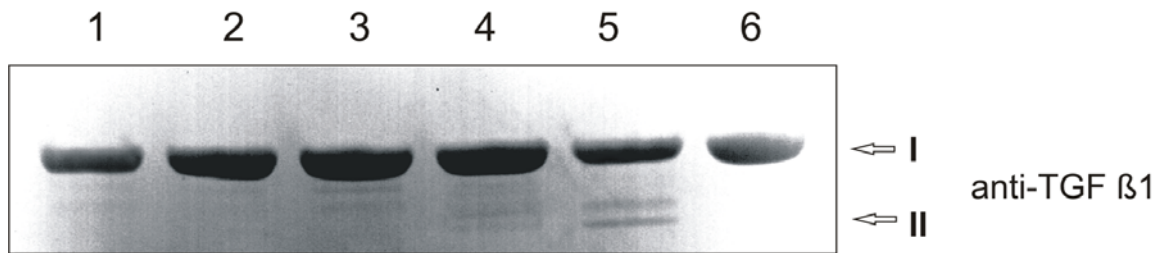
Die Zugabe hoher Konzentrationen von HRgpA (10 nM) und RgpB (10 und 100 nM), also der argininspezifischen Cysteinproteinasen, bewirkte eine deutlich gesteigerte Aktivierung von TGF  $\beta$ 1.

Das aktive TGF  $\beta$ 1 verzeichnete durch Zugabe der Cysteinproteinase HRgpA in der Konzentration von 10 nM zu den Überständen der Gingivafibroblasten einen starken Anstieg. Es wurden 1370 ( $\pm$  10) pg/ml aktives TGF  $\beta$ 1 gemessen, dies war etwa zwei Drittel des gesamten TGF  $\beta$ 1. Durch die Zugabe der Cysteinproteinase RgpB in der

Konzentration von 10 nM war das aktive TGF  $\beta$ 1 auf 1460 pg/ml gestiegen - verglichen mit dem Wert der Kontrolle auf mehr als das Vierfache. In der Konzentration von 100 nM war die Aktivierung nicht mehr so deutlich. Die Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 durch HRgpA in dieser hohen Konzentration war sehr gering, der Wert war nur wenig höher als der der Kontrolle; er betrug 320 ( $\pm$  16) pg/ml. RgpB hingegen erreichte in der hohen Konzentration zumindest fast eine Verdopplung; der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 stieg auf 590 ( $\pm$  85) pg/ml. Die Arg-Gingipaine in den niedrigen Konzentrationen von 0,01 nM, 0,1 nM und 1 nM zeigten kaum Veränderungen zum Kontrollwert.

Die lysinspezifische Cysteinproteinase hingegen führte in keiner der untersuchten Konzentrationen zu einem Anstieg des aktiven TGF  $\beta$ 1 - im Gegenteil: diese Cysteinproteinase verursachte einen Abfall des Spiegels an aktivem TGF  $\beta$ 1. Der Abfall war am deutlichsten in der Konzentration von 10 nM; der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 betrug nur noch 80 ( $\pm$  19) pg/ml. In der Konzentration von 1 nM ergab der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 noch 110 ( $\pm$  7) pg/ml. In der Konzentration von 100 nM betrug der Wert 130 ( $\pm$  23) pg/ml, in der Konzentration von 0,1 nM 210 ( $\pm$  13) pg/ml und in der Konzentration von 0,01 nM 260 ( $\pm$  36) pg/ml (Abb. 10).

### 5. 2. 3. Ergebnisse für die Western Blot-Analyse



**Abbildung 11: Western Blot-Analyse** zur Darstellung des aktiven TGF β1 und dessen Abbauprodukte nach Behandlung mit den Gingipainen, dem *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 und dem mit FFrcK (50nM) inhibierten Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277

- 1: PBS
- 2: HRgpA 10 nM
- 3: RgpB 10 nM
- 4: Kgp 10 nM
- 5: *P. gingivalis* ATCC 33277
- 6: *P. gingivalis* ATCC 33277 + 50 nM FFrcK
- I: aktives TGF β1
- II: Abbauprodukte des aktiven TGF β1

Abbauprodukte von aktivem TGF β1 konnten insbesondere nach Zugabe von *P. gingivalis* ATCC 33277 und Kgp detektiert werden. Wurde der Stamm *P. gingivalis* ATCC 33277 jedoch zuvor mit dem Inhibitor FFrcK versetzt, konnte keinerlei Abbau von TGF β1 beobachtet werden (Abb. 11).



## 6. Diskussion

Die Pathogenese von Parodontitiden stellt eine komplexe Interaktion zwischen parodontopathogenen Mikroorganismen und Immunabwehrmechanismen des Wirts dar (Ebersole und Kornman 1991). Zwar werden parodontopathogene Bakterien, wie *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* und *T. forsythia*, als Hauptauslöser progressiver parodontaler Erkrankungen angesehen (Genco et al. 1996), die parodontale Destruktion wird größtenteils aber durch die Wirtsantwort auf die Mikroorganismen und ihre Bestandteile verursacht (Birkedal-Hansen 1993).

In dieser Studie wurde die Freisetzung von TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten und dessen Aktivierung durch *P. gingivalis* bzw. seiner Cysteinproteinasen (Gingipaine) untersucht. Es existieren bereits viele Studien über den Einfluss parodontopathogener Mikroorganismen auf die Zytokinfreisetzung aus Wirtszellen (Fletcher et al. 1997, Steffen et al. 2000, Sandros et al. 2000, Eick et al. 2002), über die Wirkung von *P. gingivalis* auf die TGF  $\beta$ 1-Freisetzung ist bisher allerdings nur wenig veröffentlicht worden.

### 6. 1. Material und Methoden

In der vorliegenden Studie wurden in den Versuchen humane Gingivafibroblasten verwendet. Sie stammten von der Gingiva aus der Region eines extrahierten dritten Molars.

Diese Zellen konnten durch einfache Vermehrung im Labor vorbereitet werden. Sie wurden in niedriger Passage in den Versuchen verwendet. So konnten standardisierte Bedingungen für alle Versuche geschaffen und vergleichbare reproduzierbare Ergebnisse erlangt werden.

Gingivafibroblasten wurden in dieser Studie jeweils separat in einem Monolayer kultiviert und in die Versuchsanordnung eingebracht. Somit kann diese Versuchsanordnung nur als vereinfachtes Modell der oralen Gegebenheiten des

Parodonts angesehen werden. Zudem sind *in vivo* die verwendeten Zellen nie isoliert anzutreffen. Sie kommen mehrschichtig im Schleimhautepithel oder mit anderen Zellen im Bindegewebe mit freien Bindegewebszellen, wie z. B. Abwehrzellen, vor. Ein einschichtiger Zellrasen kann die komplexen Verhältnisse der parodontalen Anatomie selbstverständlich nicht widerspiegeln. Die Beschränkung auf eine Monolayerschicht der Zellen ermöglichte jedoch Untersuchungen im molekularen Bereich bei der Interaktion zwischen Bakterien und Zellen, wie es Ziel dieser Versuche war.

Als parodontopathogene Keime wurden *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 gewählt. *P. gingivalis* ATCC 33277 wurde als Referenzstamm schon in vielen anderen Studien verwendet (Kennell und Holt 1990, Eick und Pfister 2004, Trindade et al. 2008). *P. gingivalis*-Stämme weisen Unterschiede in Adhärenz und Invasion (Dorn et al. 2000), Kapselbildung (Dierickx et al. 2003), Virulenz (Kato et al. 2007) und Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika (Eick und Pfister 2004) auf. Die Ausprägung der Virulenzfaktoren und damit verbundene Eigenschaften von *P. gingivalis* variieren zum Teil zwischen den einzelnen Stämmen (Eick et al. 2002).

So sollten in dieser Studie durch die Berücksichtigung klinischer Isolate stammspezifische Unterschiede innerhalb eines Bakterienstamms auf die Zytokinantwort, also die Freisetzung und Aktivierung von TGF  $\beta$ 1, untersucht werden. Dazu wurden als klinische Isolate die Bakterienstämme *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 verwendet. Dabei wurden die Bakterienstämme und auch deren Cysteinproteinasen (Gingipaine) einzeln in die Versuche einbezogen. Zudem wurden in einem weiteren Versuch die Cysteinproteinasen mit Inhibitoren geblockt.

Um auch stets die gleiche Bakterienzahl zu haben, wurde diese vor jedem Versuch mit dem Fotometer eingestellt. Zur Vermeidung von Kontaminationen und damit von fehlerhaften Ergebnissen wurde stets unter der Laminarairflowbox gearbeitet.

Der Nachweis von TGF  $\beta$ 1 erfolgte nach dem ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*)-Verfahren. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren und auch

niedermolekulare Verbindungen, wie Hormone, Toxine und Pestizide, in einer Probe nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Antigen oder Antikörper werden zuvor mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens. Das verwendete Substrat wird vom Enzym umgesetzt; das Reaktionsprodukt kann durch Farbumschlag nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist eine Funktion der Antigenkonzentration, sodass der ELISA auch für quantitative Nachweise verwendet werden kann - wie es diese Studie erforderte.

Auch in zahlreichen anderen Studien wurde der ELISA für den Nachweis von TGF  $\beta$  schon verwendet (Gürkan et al. 2006, Ejeil et al. 2003, Gemmell und Seymour 1993, Skaleric et al. 1997).

Für die Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 ist die Entfernung des LAP von L-TGF  $\beta$  notwendig. Physiologisch ist Plasmin in der Lage, das LAP vom Latenz-Komplex zu entfernen. Die Aktivierung des Plasmin aus Plasminogen geschieht durch den Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Gewebetyp-Plasminogen-Aktivator (Khalil, 1999). Diese Aktivierung findet bei einer Körpertemperatur von circa 37°C statt. Deshalb muss man die Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 *in vitro* durch Erhitzen auf 99°C kritisch betrachten. Dieses Verfahren entspricht nicht den physiologischen Bedingungen.

## 6. 2. Synthese und Freisetzung von TGF $\beta$ 1

Nach der Infektion der Gingivafibroblasten mit den drei Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 wurden die Überstände nach 1,5 und 6 h auf die Freisetzung von gesamten und aktiven TGF  $\beta$ 1 untersucht.

Die Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1 zeigte gegenüber der Kontrolle kaum Veränderungen. Nur die mit dem klinischen Isolat *P. gingivalis* M5-1-2 infizierten Zellen zeigten nach 6 h eine erhöhte Menge an freigesetzten TGF  $\beta$ 1.

Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Ejeil et al. (2003), die hohe Spiegel an freigesetztem TGF  $\beta$ 1 bei Gewebeproben aus gesunder Gingiva und Proben mit schwerer Entzündung und Gewebedestruktion feststellten. Kein TGF  $\beta$ 1 wurde in Fällen milder oder moderater Entzündung nachgewiesen (Ejeil et al. 2003).

Die Gingipaine machen 85 Prozent der gesamten proteolytischen Enzymaktivität von *P. gingivalis* aus. Neben zahlreichen anderen Funktionen konnte ihnen die Freigabe (Sharp et al. 1998) und die Spaltung (Zhang et al. 1999, Banbula et al. 1999, Fletcher et al. 1998, Calkins et al. 1998) von Zytokinen nachgewiesen werden. Die Freisetzung und Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 steht in direktem Zusammenhang mit der Induktion und Depression von vielen anderen Zytokinen. Sie bilden komplexe Netzwerke in Parodontitisläsionen und ihre überlappenden und vielseitigen Effekte sollten in der Pathologie von entzündlichen Parodontalerkrankungen berücksichtigt werden (Yamazaki et al. 1997).

Zhang et al. (1999) konnten in ihrer Studie zeigen, dass sowohl gingivale als auch orale Epithelzellen IL 8 produzieren. Jedoch wurde nach Infektion mit *P. gingivalis* keine Akkumulation dieses Zytokins festgestellt. Durch einen Northern Blot konnten sie aber nachweisen, dass infizierte Epithelzellen trotz allem IL-8-mRNA exprimieren. Dieses führte zu der Annahme, dass die Zytokine nach ihrer Freisetzung zerstört wurden. Folglich inkubierten sie IL-8 mit *P. gingivalis*, was mit einem raschen Abbau des Zytokins endete. Bei Zusatz eines Proteinaseinhibitors war die Abnahme deutlich verringert, womit sie zeigen konnten, dass IL-8 von *P. gingivalis*-Proteinasen inaktiviert wird (Zhang et al. 1999).

So wurden die ermittelten Ergebnisse nicht auf ein Unvermögen der verschiedenen *P. gingivalis*-Stämme, eine Zytokinproduktion zu stimulieren, zurückgeführt, sondern darauf, dass *P. gingivalis* mit seinen Cysteinproteinasen fähig ist, die Zytokine proteolytisch abzubauen.

Die Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1 war nach 1,5 h durch alle drei Bakterienstämme im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Hier zeigten jedoch nur die mit dem Referenzstamm infizierten Gingivafibroblasten auch noch nach 6 h eine erhöhte

Menge an aktivem TGF  $\beta$ 1. Wenn davon ausgegangen wird, dass eine Infektion für die Fibroblasten Stress bedeutet, so reagieren diese darauf mit einem Abwehrmechanismus durch die Bereitstellung des antientzündlichen Zytokins TGF  $\beta$ 1. Dieses wird sogleich in aktiver Form zur Verfügung gestellt, denn nur aktives TGF  $\beta$  kann mit seinem Rezeptor interagieren und besitzt somit einen biologischen Effekt (Kahlil 1999).

Durch die Exposition der Gingivafibroblasten mit den einzelnen Cysteinproteinasen sollte die Freigabe von gesamtem und aktivem TGF  $\beta$ 1 durch diese spezifiziert werden. Die von *P. gingivalis* produzierten Cysteinproteinasen stellen einen Hauptvirulenzfaktor dieses Bakteriums dar. Die drei Formen der Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp spalten spezifisch nach Arginin (R)- und Lysin (K)-Resten. HRgpA ist eine argininspezifische Cysteinproteinase; sie ist ein nichtkovalenter, stabiler Komplex einer katalytischen Domäne und einer Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne. RgpB stellt ebenso eine argininspezifische Cysteinproteinase dar; es besitzt aber nur eine katalytische Domäne mit einer identischen Primärstruktur der katalytischen Untereinheit von HRgpA. Kgp ist eine lysinspezifische Cysteinproteinase und hat wiederum eine katalytische Domäne und eine Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne (Pavloff et al. 1997, Potempa et al. 2003).

In dieser Studie wurden diese drei Cysteinproteinasen in den Konzentrationen von 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM den Gingivafibroblasten zugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung des gesamten und auch des aktiven TGF  $\beta$ 1 aus den mit HRgpA und Kgp in hohen Konzentrationen (100 nM und 10 nM) versetzten Fibroblasten gesteigert war. Die Freigabe an aktivem TGF  $\beta$ 1 war dabei noch deutlicher. So wurde in der höchst eingesetzten Konzentration von HRgpA in den Überständen der Zellen circa dreimal so viel aktives TGF  $\beta$ 1 gefunden. Auch die mit Kgp behandelten Gingivafibroblasten setzten in den Konzentrationen von 10 und 100 nM etwa doppelt so viel aktives TGF  $\beta$ 1 frei. RgpB hingegen verursachte keine Steigerung des gesamten und aktiven TGF  $\beta$ 1 in den Zellüberständen.

Dies lässt darauf schließen, dass die Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne, welche die beiden Gingipaine HRgpA und Kgp besitzen, eine entscheidende Rolle bei der Freigabe von TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten spielt.

Sharp et al. (1998) haben festgestellt, dass die Adhäsionsdomänen der Proteinasen Zytokin-induzierende Eigenschaften haben können. Demgegenüber wurde gezeigt, dass die Spaltung von Zytokinen durch *P. gingivalis* der katalytischen Domäne von HRgpA zugeschrieben werden kann (Sharp et al. 1998).

Für das Blockieren der Cysteinproteinasen wurden in dieser Studie die Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK verwendet. FFrcK besteht aus einem lysinspezifischen Inhibitor Cbz-Phe-Lys-CH<sub>2</sub>OCO-2,4,6-Me<sub>3</sub>-Ph zur schnellen Hemmung des Kgp und einem argininspezifischen Inhibitor D-Phe-Phe-Arg-CH<sub>2</sub>Cl zur Hemmung von HRgpA und RgpB (Potempa et al. 1997). Dieser Inhibitor hemmt also alle drei Gingipaine von *P. gingivalis*. Leupeptin ist ein spezifischer Inhibitor der Arg-Gingipaine und wurde schon in anderen Studien verwendet (Brochu et al. 2001, Andrian et al. 2004, Houle et al. 2003). TLCK (N-alpha-tosyl-L-lysiny-chloromethylketon) wurde in Studien für die Inhibition des Lys-Gingipains verwendet (Brochu et al. 2001).

Durch das Blockieren der Cysteinproteinaseaktivität von *P. gingivalis* kam es allerdings zu nicht eindeutig interpretierbaren Resultaten. Die Ergebnisse aus dem Versuch der Fibroblasteninfektion mit den Gingipainen wurden nicht bestätigt. Die Freisetzung des gesamten und aktiven TGF  $\beta$ 1 war nicht nur stammspezifisch sehr verschieden, sondern auch inhibitorspezifisch. Dies lässt darauf schließen, dass die Inhibitoren nicht nur einen Einfluss auf die Cysteinproteinaseaktivität von *P. gingivalis* hatten, sondern auch eine Wirkung auf die Gingivafibroblasten ausübten. Dabei verzeichnete der Inhibitor TLCK die größte Auswirkung auf die mit den beiden klinischen Isolaten *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 infizierten Gingivafibroblasten. Hier wurde TGF  $\beta$ 1 sehr stark reduziert, in drei Proben wurde sogar kein TGF  $\beta$ 1 mehr nachgewiesen. Dies lässt einen zytotoxischen Effekt von TLCK vermuten.

In einer anderen Studie inhibierte der synthetische Proteinaseinhibitor TLCK die Transkription in Zelllinien, die *in vitro* wuchsen und wirkte in bestimmten Konzentrationen toxisch (Noonan und Noonan 1977).

Dieser mögliche Einfluss auf die Gingivafibroblasten wurde in einem weiteren Versuch dieser Studie ausgeschaltet, indem nur die Überstände der

Gingivafibroblasten mit den Bakterienstämmen beimpft wurden. Die Bakterienstämme wurden auch hier zuvor mit den Inhibitoren versetzt. Durch die Abwesenheit der Gingivafibroblasten in den Proben konnten die Inhibitoren ihre vermuteten Wirkungen auf die Fibroblasten nicht entfalten. Dadurch waren diese Ergebnisse besser interpretierbar. Die Resultate werden unter 6. 3. noch näher erläutert und diskutiert.

Die mRNA-Analyse sollte Aufschluss geben, durch welche Gingipaine die Transkription von TGF  $\beta$ 1 in Gingivafibroblasten gesteuert wird. Gingivafibroblasten wurden mit lysin- bzw argininspezifischen Cysteinproteinasen bzw. mit *P. gingivalis* ATCC 33277 versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 90 min. Im Anschluss erfolgte die Isolation der TGF  $\beta$ 1-mRNA aus den Fibroblasten. HRgpA bewirkte einen Anstieg der TGF  $\beta$ 1-mRNA, RgpB hingegen hemmte die Transkription von TGF  $\beta$ 1. Sowohl Kgp als auch der Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 hatten keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von TGF  $\beta$ 1. Wie erwartet, hemmte die Zugabe des Inhibitors FFrck zum *P. gingivalis*-Stamm ATCC 33277 die Bildung der TGF  $\beta$ 1-mRNA. Allerdings wurde die Transkription der TGF  $\beta$ 1-mRNA so massiv gehemmt, was vermuten lässt, dass der Inhibitor FFrck nicht nur die drei Cysteinproteinasen von *P. gingivalis* hemmt, sondern auch eine direkte Wirkung auf die Fibroblasten besitzt.

Diese Ergebnisse widersprechen teilweise den Ergebnissen, die durch die Infektion der Fibroblasten mit den Gingipainen erhalten wurden. Übereinstimmend wirkt HRgpA sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene stimulierend. Kgp hingegen zeigte einen Anstieg des freigesetzten TGF  $\beta$ 1 auf Proteinebene, während es in der mRNA-Analyse keine Auswirkungen auf die Freisetzung von TGF  $\beta$ 1 hatte.

Allerdings gibt die mRNA-Analyse keinen Aufschluss über die Proteinkonzentration, die letztendlich in der Zelle vorliegt. Von der mRNA bis zum funktionsfähigen Protein müssen zahlreiche Prozesse, wie z. B. Alternatives Splicing oder posttranslationale Modifikationen usw., durchlaufen werden (Brett et al. 2002, Krishna und Wold 1993). Hinzu kommen fibroblasteneigene Abbauprozesse, die das funktionsfähige Protein in seiner Wirkung, beispielsweise durch Spaltung, hemmen. Auch der Abbau durch die

Cysteinproteinasen von *P. gingivalis* kann die Menge des Proteins, welche dann tatsächlich vorliegt, wieder reduzieren.

Somit könnten sich diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse erklären lassen.

### 6. 3. Aktivierung von TGF $\beta$ 1

Durch die Zugabe der Bakterienstämme bzw. der Gingipaine auf die gewonnenen Überstände der Gingivafibroblasten sollte die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 durch diese verdeutlicht werden. Dabei sollte eine mögliche Vermehrung der Gingivafibroblasten während der Infektionsdauer und die daraus resultierende erhöhte Freigabe von TGF  $\beta$ 1 ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde eine Einflussnahme von oder auf die Gingivafibroblasten durch deren Entfernung ausgeschlossen.

So wurden nur die Überstände der Fibroblasten, in denen sich das gesamte TGF  $\beta$ 1 befindet, mit den drei Bakterienstämmen *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. gingivalis* M5-1-2 und *P. gingivalis* J374-1 versetzt und ermittelt, inwieweit diese Bakterienstämme in der Lage sind, TGF  $\beta$ 1 zu aktivieren.

Es war durch Zugabe der jeweiligen Bakterienstämme bei allen drei Proben ein Anstieg des aktiven TGF  $\beta$ 1 in den Überständen der Fibroblasten, verglichen mit den nicht infizierten Fibroblastenüberständen, zu verzeichnen. Der Bakterienstamm *P. gingivalis* J374-1 verursachte dabei fast eine Verdopplung des aktiven TGF  $\beta$ 1, wobei die Zunahme des aktiven TGF  $\beta$ 1 durch den Bakterienstamm *P. gingivalis* M5-1-2 eher gering ausfiel. Das klinische Isolat *P. gingivalis* J374-1 aktiviert also TGF  $\beta$ 1 effektiver als der Referenzstamm, wohingegen das klinische Isolat *P. gingivalis* M5-1-2 weniger aktives TGF  $\beta$ 1 als der Referenzstamm induzierte. Dieses zeigt, dass *P. gingivalis* ohne die Anwesenheit der Fibroblasten in der Lage ist, vermehrt TGF  $\beta$ 1 zu aktivieren.

Durch die Behandlung der Gingivafibroblastenüberstände mit den einzelnen Cysteinproteinasen sollte die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 durch diese spezifiziert



werden. Arg-Gingipaine in einer Konzentration von 10 nM aktivierten deutlich mehr TGF  $\beta$ 1. HRgpA und RgpB haben in dieser Konzentration, verglichen mit der Kontrolle, mehr als das Vierfache an TGF  $\beta$ 1 aktiviert. Das entspricht etwa zwei Drittel des gesamten TGF  $\beta$ 1. Dieses demonstriert, dass die argininspezifischen Gingipaine HRgpA und RgpB für die Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 verantwortlich sind.

Bei Lys-Gingipain Kgp zeigte sich im Gegensatz zu den Arg-Gingipainen in der Konzentration von 10 nM eine Reduktion der Menge an aktivem TGF  $\beta$ 1 in den Fibroblastenüberständen. Der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 betrug nur noch etwa ein Viertel des TGF  $\beta$ 1-Wertes der Kontrolle. Somit fördert das lysinspezifische Gingipain Kgp den Abbau von aktivem TGF  $\beta$ 1. Dieses konnte durch die Western Blot-Analyse bestätigt werden, hier zeigte sich eine zusätzliche Bande unterhalb des Molekulargewichts von TGF  $\beta$ 1.

Werden spezifische Inhibitoren eingesetzt, so sollte es durch die Inhibition der Arg-Gingipaine zu einer Hemmung der Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 kommen. Weiterhin sollte durch die Hemmung des Lys-Gingipains mittels spezifischen Inhibitors der Spiegel an aktivem TGF  $\beta$ 1 ansteigen. In dieser Studie zeigten sich die Auswirkungen der Inhibitoren in dieser Weise in geringem Ausmaß. Das könnte darauf hindeuten, dass die Inkubationszeit von 90 min zu kurz war. Allerdings waren hier die Wirkungen der Inhibitoren auf die Gingivafibroblasten ausgeschlossen, da die Fibroblasten vor der Inkubation entfernt wurden.

Durch den Inhibitor TLCK, welcher Kgp hemmt, ist ein geringer Anstieg des aktiven TGF  $\beta$ 1 zu verzeichnen, wenn man die Werte mit denen ohne Inhibitor vergleicht. Das bestätigt die Annahme, dass es durch eine Hemmung des Abbaus von TGF  $\beta$ 1 zu einem Anstieg des TGF  $\beta$ 1 kommt.

Durch den Inhibitor Leupeptin, welcher beide argininspezifischen Cysteinproteinasen hemmt, ist bei den TGF  $\beta$ 1-Werten der Fibroblastenüberstände, die mit den *P. gingivalis* Stämmen ATCC 33277 und J374-1 infiziert wurden, ein geringer Abfall des aktiven TGF  $\beta$ 1 zu verzeichnen. Auch dieses bestätigt, dass es durch eine Hemmung der Aktivierung zu einem Abfall des aktiven TGF  $\beta$ 1 kommt. Der TGF  $\beta$ 1-

Wert des Fibroblastenüberstandes, welcher mit dem Bakterienstamm *P. gingivalis* M5-1-2 infiziert wurde, ist entgegen der Erwartung geringfügig gestiegen.

Durch den Inhibitor FFrcK, welcher die lysin- und die argininspezifischen Cysteinproteinasen hemmt, kam es bei allen drei *P. gingivalis*-Stämmen zu einer Hemmung der Aktivierung des TGF  $\beta$ 1. Somit zeigte sich, dass dieser Inhibitor offensichtlich besonders gut die argininspezifischen Cysteinproteinasen hemmte, wobei aber auch zu berücksichtigen ist, dass die molaren Konzentrationen dieser argininspezifischen Cysteinproteinasen (HrgpA, RgpB) im bakteriellen Organismus *P. gingivalis* ungefähr 2-3fach höher sind als die der lysinspezifischen Cysteinproteinase (Kgp) (Potempa et al. 1997). Der Wert des aktiven TGF  $\beta$ 1 in den Überständen, die mit dem mittels FFrcK gehemmten *P. gingivalis*-Stamm M5-1-2 infiziert wurden, pegelte sich sogar auf dem Niveau des TGF  $\beta$ 1-Wertes der Kontrolle ein. Dieser Inhibitor zeigt am deutlichsten, dass es durch die Hemmung der Gingipaine von *P. gingivalis* zu einer Hemmung der gesteigerten Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 kommt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *P. gingivalis* das Netzwerk der Zytokine stört, nicht nur indem er die Freisetzung von Zytokinen aus dem Wirtsgewebe anregt, sondern auch indem er die Zytokine aus ihrer lokalen Umwelt entfernt. Somit scheint *P. gingivalis* die Immunantwort modulieren zu können. Weiterführende Untersuchungen sollten den Einsatz von Deletionsmutanten einbeziehen, um die erzielten Ergebnisse zu spezifizieren.

## 7. Schlussfolgerung

Die Cysteinproteinasen stellen die wichtigsten Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* dar und tragen wesentlich zur Pathogenese der Parodontitiden bei. Die Gingipaine machen 85 Prozent der gesamten proteolytischen Enzymaktivität von *P. gingivalis* aus. Neben zahlreichen anderen Funktionen kann ihnen die Freigabe und die Spaltung von Zytokinen zugeordnet werden.

*P. gingivalis* stimuliert die Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten, er induziert jedoch nicht eine erhöhte Freigabe des gesamten TGF  $\beta$ 1. Im Gegensatz zu RgpB fördert HRgpA die mRNA-Expression und die Expression des Proteins von TGF  $\beta$ 1. Auf Proteinebene induziert ebenso Kgp eine erhöhte Freisetzung von TGF  $\beta$ 1. Dies kann im Zusammenhang mit der Hämagglutinin/Adhäsionsdomäne stehen, die beide Cysteinproteinasen besitzen.

Die argininspezifischen Cysteinproteinasen HRgpA und RgpB fördern eine Aktivierung von TGF  $\beta$ 1. Die lysinspezifische Cysteinproteinase Kgp reduziert die Menge an aktivem TGF  $\beta$ 1 durch Spaltung des Proteins.

*P. gingivalis*-Proteinasen sind einerseits für eine Freigabe und Aktivierung von TGF  $\beta$ 1 und andererseits für einen Abbau von TGF  $\beta$ 1 verantwortlich. Somit stört *P. gingivalis* das Netzwerk der Zytokine, nicht nur indem er die Freisetzung von Zytokinen aus dem Wirtsgewebe anregt, sondern auch indem er die Zytokine aus ihrer lokalen Umwelt entfernt. *P. gingivalis* moduliert die Immunantwort.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. 1990. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand*, 48(6):415-423.
2. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. 2004. *In vitro* models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 72(8):4689-4698.
3. Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4(1):1-6.
4. Banbula A, Bugno M, Kuster A, Heinrich PC, Travis J, Potempa J. 1999. Rapid and efficient inactivation of IL-6 by lysine and arginine specific proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(3):598-602.
5. Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JW II, Wilner GD. 1983. Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. *Science*, 220(4598):728-731.
6. Bickel M. 1993. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J. Periodontol*, 64(5):456-460.
7. Birkedal-Hansen H. 1993. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, 28(6):500-510.
8. Bizios R, Lai L, Fenton JW II, Malik AB. 1986. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol*, 128(3):485-490.
9. Brett D, Pospisil H, Valcárcel J, Reich J, Bork P. 2002. Alternative splicing and genome complexity. *Nat Genet*, 30(1):29-30.
10. Brochu V, Grenier D, Nakayama K, Mayrand D. 2001. Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys- gingipain activities. *Oral Microbiol Immunol*, 16(2):79-87.
11. Calkins CC, Platt K, Potempa J, Travis J. 1998. Inactivation of tumor necrosis factor by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications for immune evasion. *J Biol Chem*, 273(12):6611-6614.

12. Cornellini R, Rubini C, Fioroni M, Favero GA, Strocchi R, Piattelli A. 2003. Transforming growth factor-beta1 expression in the periimplant soft tissues of healthy and failing dental implants. *J Periodontol*, 74(4): 446-450.
13. Darveau RP, Tanner A, Page RC. 1997. The microbial challenge in Periodontitis. *Periodontol 2000*, 14(1):12-32.
14. De Michele MAA, Moon DG, Fenton JW II, Minnear FL. 1990. Thrombin's enzymatic activity increases permeability of endothelial cell monolayers. *J Appl Physiol*, 69(5):1599-1606.
15. De Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. 2000. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 20(5):486-497.
16. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massagué J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF. 1996. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF beta family signals. *Cell*, 87(2):173.
17. Dierickx K, Pauwels M, Laine ML, Van Eldere J, Cassiman JJ, van Winkelhoff AJ, van Steenberghe D, Quirynen M. 2003. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* serotypes to pocket epithelium. *J Periodontol*, 74(6):844-848.
18. Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Proquleske-Fox A. 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*, 187(2):139-144.
19. Ebersole JL, Kornman KS. 1991. Systemic antibody responses to oral microorganisms in the cynomolgus monkey: development of methodology and longitudinal responses during ligature-induced disease. *Res Immunol*, 142(9):829-839.
20. Ebersole JL, Singer RE, Steffensen B, Filloon T, Kornman KS. 1993. Inflammatory mediators and immunoglobulins in GCF from healthy, gingivitis and parodontitis sites. *J Periodontal Res*, 28(6):543-546.
21. Ebersole JL. 2003. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000*, 31(1):135-166.

22. Eick S, Pfister W. 2004. Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an *in vitro* study. J Periodontol, 75(10):1327-1334.
23. Eick S, Rödel J, Einax JW, Pfister W. 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. Oral Microbiol Immunol, 17(4):201-208.
24. Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, Gogly B. 2003. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? J Periodontol, 74(2):196-201.
25. Ellen RP. 1999. Perturbation and exploitation of host cell cytoskeleton by periodontal pathogens. Microbes Infect, 1(8):621-632.
26. Fernandez T, Amoroso S, Sharpe S, Jones GM, Bliskovski V, Kovalchuk A, Wakefield LM, Kim SJ, Potter M, Letterio JJ. 2002. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a novel ligand-dependent mechanism. J Exp Med, 195(10):1247-1255.
27. Flad HD, Gemsa D, 1991. Zytokine. In: Gemsa D, Kalden JR, Resch K, Hrsg. Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme-Verlag, 45-61.
28. Fletcher J, Nair S, Poole S, Henderson B, Wilson M. 1998. Cytokine degradation by biofilms of *Porphyromonas gingivalis*. Curr Microbiol, 36(4):216-219.
29. Fletcher J, Reddi K, Poole S, Nair S, Henderson B, Tabona P, Wilson M. 1997. Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. J Periodontal Res, 32(2):200-205.
30. Gemell E, Seymour GJ. 1993. Interleukin 1, interleukin 6 und transforming growth factor- $\beta$  production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. J Periodont Res, 28(2):122-129.
31. Genco RJ, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky S. 1996. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol, 1(1):926-932.

32. Glockmann E und Köhler J. 1998. Ursachen für Zahnextraktionen in den neuen Bundesländern. Dtsch Zahnärztl Z, 53(1):39-41.
33. Gold LI. 1990. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. Review. Crit. Rev. Oncog, 10(4):303-360.
34. Greenstein G, Lamster I. 1997. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. J. Periodontol, 68(5):421-431.
35. Gürkan A, Emingil G, Cinarcik S, Berdeli A. 2006. Gingival crevicular fluid transforming growth factor-beta 1 in several forms of periodontal disease. Arch Oral Biol, 51(10):906-912.
36. Haffajee AD, Socransky SS. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontol 2000, 5(1):78-111.
37. Hellwig E, Klimek J, Attin T. 2007. Anamnese, Befund und Diagnose bei parodontalen Erkrankungen. In: Hellwig E, Klimek J, Attin T (Hrsg.). Einführung in die Zahnerhaltung. 4. Auflage. München; Jena: Urban und Fischer Verlag, 401-428.
38. Hetz G. 2000. Parodontologie heute: Teil 1 – Grundlagen und prinzipielle Überlegungen. Dentalspiegel 20:, 42-44.
39. Hinode D, Nagata A, Ichimiya S, Hayashi H, Morioka M, Nakamura R. 1992. Generation of plasma kinin by three types of protease isolated from *Porphyromonas gingivalis* 381. Arch Oral Biol, 37(10):859-861.
40. Hoffmann O, Klaushofer K, Koller K, Peterlik M, Mavreas T, Stern P. 1986. Indomethacin inhibits thrombin, but not thyroxin-stimulated resorption of fetal rat limb bones. Prostaglandins, 31(4):601-608.
41. Houle MA, Grenier D, Plamondon P, Nakayama K. 2003. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-Gingipain. FEMS Microbiol Lett, 221(2):181-185.
42. Imamura T. 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol, 74(1):111-118.
43. Imamura T, Pike RN, Potempa J, Travis J. 1994. Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. J Clin Invest, 94(1):361-367.

44. Imamura T, Pike RN, Potempa J, Travis J. 1995. Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 63(5):1999-2003.
45. Imamura T, Potempa J, Pike RN, Moore JN, Barton MH, Travis J. 1995. Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation: implications for bleeding tendency at periodontitis sites. Infect Immun, 63(12):4877-4882.
46. Imamura T, Potempa J, Tanase S, Travis J. 1997. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem, 272(25):16062-16067.
47. Imamura T, Potempa J, Travis J. 2000. Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. Microb Pathog, 29(3):155-163.
48. Imamura T, Tanase S, Hamamoto T, Potempa J, Travis J. 2001. Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Biochem J, 353(2):325-331.
49. Imamura T, Banbula A, Pereira PJB, Travis J, Potempa J. 2001. Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem, 276(22):18984-18991.
50. Imamura T, Travis J, Potempa J. 2003. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. Curr Protein Pept Sci, 4(6):443-450.
51. Jagels MA, Ember JA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. 1996. Cleavage of the human C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*: cleavage of leukocyte C5a receptor. Adv Exp Med Biol, 389:155-164.
52. Jagels MA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE. 1996. Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 64(6):1984-1991.
53. Johansson A, Bergenholtz A, Holm SE. 1996. Strong cytotoxicity to human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. J Periodont Res, 31(7):477-482.



54. Kaminishi H, Cho T, Itoh T, et al. 1993. Vascular permeability enhancing activity of *Porphyromonas gingivalis* protease in guinea pigs. FEMS Microbiol Lett, 114(1):109-114.
55. Kato T, Kawai S, Nakano K, Inaba H, Kuboniwa M, Nakagawa I, Tsuda K, Omori H, Ooshima T, Yoshimori T, Amano A. 2007. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. Cell Microbiol, 9(3):753-765.
56. Kennell W, Holt SC. 1990. Comparative studies of the outer membranes of *Bacteroides gingivalis*, strains ATCC 33277, W50, W83, 381. Oral Microbiol Immunol, 5(3):121-130.
57. Khalil N. 1999. TGF- $\beta$ : from latent to active. Microbes Infect, 1(15):1255-1263.
58. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. 1997. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontol 2000, 14(1):33-53.
59. Krishna RG, Wold F. 1993. Post-translational modification of proteins. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 67:265-298.
60. Lamont RJ, Oda D, Persson R et al. 1992. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. Oral Microbiol Immunol; 7(6):364-367.
61. Lamont RJ, Jenkinson HF. 1998. Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol Mol Biol Rev, 62(4):1244-1263.
62. Löe H, Theilade E, Jensen SB. 1965. Experimental gingivitis in man. J Periodontol, 36:177-187.
63. Löffler G, Petrides PE. Hrsg. 1998. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
64. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. 1985. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. J Periodontol, 56(8):447-456.
65. Loomer PM, Sigusch B, Sukhu B, Ellen RP, Tenenbaum HC. 1994. Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* 2561 on osteogenesis *in vitro*. Infect Immun, 62(4):1289-1297.

66. Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE, Vrotsos IA. 2003. Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol*, 5(3):63-70.
67. McKeown STW, Hyland PL, Locke M, Mackenzie IC, Irwin CR. 2003. Keratinocyte growth factor and scatter factor expression by regionally defined oral fibroblasts. *Eur J Oral Sci*, 111(1):42-50.
68. Mikolajczyk-Pawlinska J, Kordula T, Pavloff N, Pemberton PA, Chen WC, Travis J, Potempa J. 1998. Genetic variation of *Porphyromonas gingivalis* genes encoding gingipains, cysteine proteinases with arginine or lysine specificity. *Biol Chem*, 379(2):205-211.
69. Mikolajczyk-Pawlinska J, Travis J, Potempa J. 1998. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal diseases. *FEBS Letters*, 440(3):282-286.
70. Moore WEC und Moore LVH 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol*. 2000, 5(1):66-77.
71. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, 114(24):4359-4369.
72. Noonan NE, Noonan KD. 1977. The effect of TLCK on transcription and its role in modifying cell growth. *J Cell Physiol*, 92(1):137-143.
73. Novak MJ, Novak KF. 1996. Early-onset periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 3:45-58.
74. Oleksy A, Banbula A, Bugno M, Travis J, Potempa J. 2002. Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog*, 32(4):173-181.
75. Page RC und Kornmann KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000, 14(1):9-11.
76. Pavloff N, Pemberton PA, Potempa J, Chen WCA, Pike RN, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J, Barr PJ. 1997. Molecular cloning and characterization of *Porphyromonas gingivalis* Lysine-specific Gingipain. A new member of

- an emerging family of pathogenetic bacterial proteinases. J Biol Chem, 272(3):1595-1600.
77. Pavloff N, Potempa J, Pike RN, Prochazka V, Kiefer MC, Travis J, Barr PJ. 1995. Molecular cloning and structural characterization of the Arg-gingipain proteinase of *Porphyromonas gingivalis*. Biosynthesis as a proteinase-adhesin polyprotein. J Biol Chem, 270(3):1007-1010.
  78. Pike RN, Potempa J, McGraw W, Coetzer TH, Travis J. 1996. Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol, 178(10):2876-2882.
  79. Potempa J, Pavloff N, Travis J. 1995. *Porphyromonas gingivalis*: a proteinase/gene accounting audit. Trend Microbiol, 3(11):430-434.
  80. Potempa J, Pike R, Travis J. 1997. Titration and mapping of the active site of cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (gingipains) using peptidyl chloromethanes. Biol Chem, 378(3-4):223-230.
  81. Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. 2003. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. Curr Protein Pept Sci, 4(6):397-407.
  82. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. 2000. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. J Dent Res, 79:1808-1814.
  83. Schätzle M, Loe H, Bürgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. 2003. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. J Clin Periodontol, 30(10):887-901.
  84. Schilke R, Haker S, Geurtsen W. 1995. Das Keimspektrum bei der juvenilen und rasch fortschreitenden (marginalen) Parodontitis. Dtsch Zahnärztl Z, 50:351.
  85. Sharp L, Poole S, Reddi K, Fletcher J, Nair S, Wilson M, Curtis M, Henderson B, Tabona P. 1998. A lipid A-associated protein of *Porphyromonas gingivalis*, derived from the haemagglutinating domain of the RI protease gene family, is a potent stimulator of interleukin 6 synthesis. Microbiology, 144(11):3019-3026.

86. Skaleric U, Kramar B, Petelin M, Pavlica Z, Wahl SM. 1997. Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. *Eur J Oral Sci*, 105(2):136-142.
87. Slots J. 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 6(5):351-382.
88. Socransky SS, Haffajee AD. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol*, 63(4):322-331.
89. Socransky SS, Haffajee AD. 1994. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl*, 18: 684-693.
90. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini Ma, Smith C, Kent Jr RL. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25(2):134-144.
91. Sojar HT, Sharma A, Genco RJ. 2002. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae bind to cytokeratin of epithelial cells. *Infect Immun*, 70(1):96-101.
92. Staudte H, Sigusch BW, Klinger G, Glockmann E. 2003. Hemmung der zytotoxischen Wirkung von *P. gingivalis* durch Ascorbinsäure. *Deutsch Zahnärztl Z*, 58(5):295-297.
93. Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL. 2000. *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol*, 15(3):172-180.
94. Steinsvoll S, Halstensen TS, Schenck K. 1999. Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol*, 26(6):366-373.
95. Taubman MA, Kawai T. 2001. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(2):125-135.
96. Theilade J, Attström R. 1985. Distribution and ultrastructure of subgingival plaque in beagle dogs with gingival inflammation. *J Periodontal Res*, 20(2):131-145.
97. Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. 1997. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodontal Res*, 32(1):120-125.

98. Trindade SC, Gomes-Filho IS, Meyer RJ, Vale VC, Pugliese L, Freire SM. 2008. Serum antibody levels against *Porphyromonas gingivalis* extract and its chromatographic fraction in chronic and aggressive periodontitis. J Int Acad Periodontol, 10(2):50-58.
99. Viček J, Le J. 1994. Immunology of Cytokines: An Introduction. In: Thomson A (Hrsg.). The Cytokine Handbook. 2. Aufl. San Diego: Academic Press Limited, 3-4.
100. Wilson M, Reddi K, Henderson B. 1996. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodontal Res, 31(6):393-407.
101. Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J, Hugli TE. 1992. Activation of complement component C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. J Biol Chem, 267(26):18902-18907.
102. Yamasaki M, Nakata K, Imaizumi I, Iwama A, Nakane A, Nakamura H. 1998. Cytotoxic effect of endodontic bacteria on periapical fibroblasts. J Endod, 24(8):534-539.
103. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y, Gemmell E, Seymour GJ, Hara K. 1997. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. Oral Microbiol Immunol, 12(5):281-287.
104. Yun PLW, De Carlo AA, Hunter N. 1999. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human gamma interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 67(6):2986-2995.
105. Zhang J, Dong H, Kashket S, Duncan MJ. 1999. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. Microb Pathog, 26(5):275-280.

## 9. Anhang

### Zusammensetzung der Gele, Puffer und Detergentien bei der Western Blot-Analyse

#### Sammelgel (4%) 5 ml:

- 3,05 ml dH<sub>2</sub>O
- 1,25 ml Gel buffer pH 6,8
- 0,65 ml Acrylamid//Biscrylamid
- 50 µl SDS (10%)
- 25 µl APS
- 5 µl TEMED

#### Trenngel (12 %) 10 ml:

- 3,25 ml dH<sub>2</sub>O
- 2,5 ml Gel buffer pH 8,8
- 4 ml Acrylamid/Biscrylamid
- 100 µl SDS (10 %ig)
- 50 µl APS
- 5 µl TEMED

#### Elektrophorese-Puffer:

##### Kathodenpuffer (pH 8,25)

- 0,1 M Tris-HCL
- 0,1 M Tricine
- 0,1 % SDS

##### Anodenpuffer (pH 8,9)

- 0,2 M Tris-HCL

Puffer für Elektrotransfer (pH 8,3):

- 6,06 g Tris (25 mM)
- 28,8 g Glycin (192 mM)
- in 1500 ml Aqua dest. gelöst
- 400 ml 20 %iges Methanol zugegeben
- auf 2 l mit Aqua dest. aufgefüllt

Ponceau S-Färbelösung:

- 0,25 % Ponceau S in 1 % Essigsäure gelöst

TBS 2000 ml (pH 7,5):

- 4,84 g Tris (Trisma) 20 mM
- 58,4 g NaCl 0,5 M
- in 1800 ml Aqua dest. gelöst
- pH von 7,5 mit HCL eingestellt
- mit Aqua dest. auf 2000 ml aufgefüllt

TBST:

- 0,5 ml Tween 20 in 1000 ml TBS gelöst

BSA/TBST:

- 1% BSA in TBST gelöst

### Wertetabellen der Mittelwerte (+SD) zu den Abbildungen 2 bis 10

**Tabelle 3** (zu Abbildung 2): Freisetzung des gesamten TGF  $\beta 1$  aus Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h Inkubation mit verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen [pg/ml]

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	1,5 h	6 h
ATCC 33277	500 $\pm$ 161	1084 $\pm$ 236
M5-1-2	459 $\pm$ 101	1345 $\pm$ 135
J374-1	445 $\pm$ 223	885 $\pm$ 115
Kontrolle	547 $\pm$ 54	945 $\pm$ 74

**Tabelle 4** (zu Abbildung 3): Freisetzung des aktiven TGF  $\beta 1$  aus Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h Inkubation mit verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen [pg/ml]

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	1,5 h	6 h
ATCC 33277	86 $\pm$ 8	135 $\pm$ 15
M5-1-2	75 $\pm$ 25	105 $\pm$ 6
J374-1	72 $\pm$ 10	106 $\pm$ 12
Kontrolle	52 $\pm$ 9	115 $\pm$ 16



**Tabelle 5** (zu Abbildung 4): Freisetzung des gesamten TGF  $\beta 1$  aus Gingivafibroblasten nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in verschiedenen Konzentrationen [pg/ml]

Konzentration [nM]	HrgpA	RgpB	Kgp	Medium ohne Aktivierung	Medium mit Aktivierung
100	1044 $\pm$ 144	615 $\pm$ 95	860 $\pm$ 89	621 $\pm$ 53	593 $\pm$ 45
10	579 $\pm$ 65	664 $\pm$ 58	810 $\pm$ 102		
1	626 $\pm$ 75	596 $\pm$ 25	603 $\pm$ 63		
0,1	579 $\pm$ 57	664 $\pm$ 66	592 $\pm$ 35		
0,01	605 $\pm$ 36	588 $\pm$ 38	583 $\pm$ 28		

**Tabelle 6** (zu Abbildung 5): Freisetzung des aktiven TGF  $\beta 1$  aus Gingivafibroblasten nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in verschiedenen Konzentrationen [pg/ml]

Konzentrationen [nM]	HrgpA	RgpB	Kgp	Medium ohne Aktivierung	Medium mit Aktivierung
100	399 $\pm$ 25	122 $\pm$ 8	290 $\pm$ 12	70 $\pm$ 3	131 $\pm$ 10
10	144 $\pm$ 14	145 $\pm$ 18	322 $\pm$ 24		
1	102 $\pm$ 8	129 $\pm$ 6	138 $\pm$ 10		
0,1	117 $\pm$ 7	159 $\pm$ 18	116 $\pm$ 21		
0,01	110 $\pm$ 9	122 $\pm$ 5	121 $\pm$ 23		

**Tabelle 7** (zu Abbildung 6): Freisetzung des gesamten TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach a) 1,5 und b) 6 h Inkubation mit den mit den Inhibitoren versetzten *P. gingivalis*-Stämmen [pg/ml]

a)

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	ohne Inhibitor	50 $\mu$ M FFrcK	10 $\mu$ M Leupeptin	10 $\mu$ M TLCK
ATCC 33277	500 $\pm$ 161	424 $\pm$ 58	553 $\pm$ 68	540 $\pm$ 89
M5-1-2	459 $\pm$ 101	39 $\pm$ 12	240 $\pm$ 121	0 $\pm$ 0
J374-1	445 $\pm$ 223	210 $\pm$ 85	138 $\pm$ 52	88 $\pm$ 23
Kontrolle	547 $\pm$ 54			

b)

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	ohne Inhibitor	50 $\mu$ M FFrcK	10 $\mu$ M Leupeptin	10 $\mu$ M TLCK
ATCC 33277	1084 $\pm$ 236	326 $\pm$ 56	419 $\pm$ 120	482 $\pm$ 84
M5-1-2	1345 $\pm$ 135	603 $\pm$ 75	260 $\pm$ 52	68 $\pm$ 12
J374-1	885 $\pm$ 115	213 $\pm$ 27	512 $\pm$ 75	245 $\pm$ 65
Kontrolle	945 $\pm$ 74			

**Tabelle 8** (zu Abbildung 7): Freisetzung des aktiven TGF  $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach a) 1,5 und b) 6 h Inkubation mit den mit den Inhibitoren versetzten *P. gingivalis*-Stämmen [pg/ml]

a)

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	ohne Inhibitor	50 $\mu$ M FFrcK	10 $\mu$ M Leupeptin	10 $\mu$ M TLCK
ATCC 33277	86 $\pm$ 8	18 $\pm$ 4	22 $\pm$ 3	45 $\pm$ 12
M5-1-2	75 $\pm$ 25	0 $\pm$ 0	38 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0
J374-1	72 $\pm$ 10	47 $\pm$ 3	148 $\pm$ 12	2 $\pm$ 1,6
Kontrolle	52 $\pm$ 9			

b)

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	ohne Inhibitor	50 $\mu$ M FFrcK	10 $\mu$ M Leupeptin	10 $\mu$ M TLCK
ATCC 33277	135 $\pm$ 15	80 $\pm$ 8	80 $\pm$ 5	118 $\pm$ 13
M5-1-2	105 $\pm$ 6	33 $\pm$ 4	50 $\pm$ 7	28 $\pm$ 3
J374-1	106 $\pm$ 12	34 $\pm$ 5	100 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0
Kontrolle	115 $\pm$ 16			

**Tabelle 9** (zu Abbildung 8): mRNA-Analyse von TGF  $\beta$ 1-mRNA aus Gingivafibroblasten nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in der Konzentration von 100 nM, dem Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277 und dem mit FFrcK (50nM) inhibierten Bakterienstamm *P. gingivalis* ATCC 33277. Die Menge [pg/ml] der TGF  $\beta$ 1-mRNA in der PBS-Probe wurde auf 1 gesetzt.

Proben	m-RNA-Expression
PBS	1,00 $\pm$ 0,27
HRgpA	10,57 $\pm$ 3,50
RgpB	0,36 $\pm$ 0,24
Kgp	0,90 $\pm$ 0,45
<i>P. gingivalis</i> ATCC	0,74 $\pm$ 0,51
<i>P. gingivalis</i> ATCC + FFrcK	0,05 $\pm$ 0,03

**Tabelle 10** (zu Abbildung 9): Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 nach 1,5 h Inkubation mit den *P. gingivalis*-Stämmen und den mit den Inhibitoren versetzten Bakterienstämmen [pg/ml]

<i>P. gingivalis</i> -Stamm	ohne Inhibitor	FFrcK	Leupeptin	TLCK
ATCC 33277	260 $\pm$ 9	201 $\pm$ 17	245 $\pm$ 18	324 $\pm$ 10
M5-1-2	206 $\pm$ 24	167 $\pm$ 3	244 $\pm$ 49	272 $\pm$ 20
J374-1	360 $\pm$ 12	266 $\pm$ 29	314 $\pm$ 39	385 $\pm$ 9
Kontrolle	186 $\pm$ 3			
gesamtes TGF $\beta$ 1	752 $\pm$ 59			

**Tabelle 11** (zu Abbildung 10): Aktivierung des TGF  $\beta$ 1 nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in verschiedenen Konzentrationen [pg/ml]

Konzentration [nM]	HrgpA	RgpB	Kgp	Kontrolle	gesamtes TGF $\beta$ 1
100	320 $\pm$ 16	590 $\pm$ 85	130 $\pm$ 23	310 $\pm$ 15	1970 $\pm$ 105
10	1370 $\pm$ 10	1460 $\pm$ 23	80 $\pm$ 19		
1	400 $\pm$ 32	260 $\pm$ 55	110 $\pm$ 7		
0,1	230 $\pm$ 66	250 $\pm$ 26	210 $\pm$ 13		
0,01	280 $\pm$ 45	340 $\pm$ 32	260 $\pm$ 36		

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb.1 Schematische Darstellung der TGF $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion durch Smadproteine (Abbildung erstellt nach Angaben von Moustakas et al. 2001 und Fernandez et al. 2002)....	16
Abb. 2 Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 aus den mit den Bakterienstämmen <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277, <i>P. gingivalis</i> M5-1-2 und <i>P. gingivalis</i> J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h.....	36
Abb. 3 Freisetzung des aktiven TGF $\beta$ 1 aus den mit den Bakterienstämmen <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277, <i>P. gingivalis</i> M5-1-2 und <i>P. gingivalis</i> J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h.....	37
Abb. 4 Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 nach Zugabe der Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM zu den Gingivafibroblasten und einer Inkubationszeit von 90 min.....	38
Abb. 5 Freisetzung des aktiven TGF $\beta$ 1 nach Zugabe der Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM zu den Gingivafibroblasten und einer Inkubationszeit von 90 min.....	39
Abb. 6 Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 aus den mit den Bakterienstämmen <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277, <i>P. gingivalis</i> M5-1-2 und <i>P. gingivalis</i> J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach Zugabe der Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK nach 1,5 und 6 h.....	41
Abb. 7 Freisetzung des aktiven TGF $\beta$ 1 aus den mit den Bakterienstämmen <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277, <i>P. gingivalis</i> M5-1-2 und <i>P. gingivalis</i> J374-1 infizierten Gingivafibroblasten nach Zugabe der Inhibitoren FFrcK, Leupeptin und TLCK nach 1,5 und 6 h.....	43

Abb. 8	mRNA-Analyse von TGF $\beta$ 1-mRNA aus Gingivafibroblasten nach Behandlung mit den Gingipainen in der Konzentration von 100 nM, dem Bakterienstamm <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 und dem mit FFrck (50nM) inhibierten Bakterienstamm <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277.....	45
Abb. 9	Aktivierung des TGF $\beta$ 1 durch die Bakterienstämme <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277, <i>P. gingivalis</i> M5-1-2 und <i>P. gingivalis</i> J374-1 und Hemmung der Aktivierung durch Zugabe der Inhibitoren FFrck, Leupeptin und TLCK zu den Bakterienstämmen vor der Infektion...	46
Abb. 10	Aktivierung des TGF $\beta$ 1 durch die Gingipaine HRgpA, RgpB und Kgp in den Konzentrationen 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM und 0,01 nM.....	48
Abb. 11	Western Blot-Analyse zur Darstellung des aktiven TGF $\beta$ 1 und dessen Abbauprodukte nach Behandlung mit den Gingipainen, dem <i>P. gingivalis</i> -Stamm ATCC 33277 und dem mit FFrck (50 nM) inhibierten Bakterienstamm <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277.....	50

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1	Pipettierschema für die Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch <i>P. gingivalis</i> 28
Tab. 2	Pipettierschema für die Aktivierung von TGF $\beta$ 1 durch die Gingipaine ..... 29
Tab. 3	(zu Abbildung 2): Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h Inkubation mit verschiedenen <i>P. gingivalis</i> -Stämmen [pg/ml]..... 74
Tab. 4	(zu Abbildung 3): Freisetzung des aktiven TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach 1,5 und 6 h Inkubation mit verschiedenen <i>P. gingivalis</i> -Stämmen [pg/ml]..... 74
Tab. 5	(zu Abbildung 4): Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in verschiedenen Konzentration [pg/ml]..... 75
Tab. 6	(zu Abbildung 5): Freisetzung des aktiven TGF $\beta$ 1 aus den Gingivafibroblasten nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in verschiedenen Konzentrationen [pg/ml]..... 75
Tab. 7	(zu Abbildung 6): Freisetzung des gesamten TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach a) 1,5 und b) 6h Inkubation mit den Inhibitoren versetzten <i>P. gingivalis</i> -Stämmen [pg/ml]..... 76
Tab. 8	(zu Abbildung 7): Freisetzung des aktiven TGF $\beta$ 1 aus Gingivafibroblasten nach a) 1,5 h und b) 6 h Inkubation mit den Inhibitoren versetzten <i>P. gingivalis</i> -Stämmen [pg/ml]..... 77
Tab. 9	(zu Abbildung 8): mRNA-Analyse von TGF $\beta$ 1-mRNA aus Gingivafibroblasten nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in der Konzentration von 100 nM, dem Bakterienstamm <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 und dem mit FFrcK (50nM) inhibierten Bakterienstamm <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277..... 78
Tab. 10	(zu Abbildung 9): Aktivierung des TGF $\beta$ 1 nach 1,5 h Inkubation mit den <i>P. gingivalis</i> -Stämmen und den mit den Inhibitoren versetzten Bakterienstämmen [pg/ml]..... 78



Tab. 11	(zu Abbildung 10): Aktivierung des TGF $\beta$ 1 nach 1,5 h Inkubation mit den Gingipainen in verschiedenen Konzentrationen [pg/ml].....	79
---------	--	----

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister

PD Dr. med. habil. Sigrun Eick,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 03.12.2008

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name	Wölke
Vorname	Nicole
Geboren	am 16. Januar 1977 in Erfurt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig, 1 Kind

### **Schul Ausbildung**

1983 – 1985	Polytechnische Oberschule „Dr. Theodor Neubauer“, Erfurt
1985 – 1991	Polytechnische Oberschule mit erweitertem Russischunterricht „Alexander S. Puschkin“, Erfurt
1991 – 1995	Königin-Luise-Gymnasium, Erfurt
Abschluss:	Allgemeine Hochschulreife

### **Berufsausbildung**

08/1996 – 07/1999	Ausbildungsberuf Versicherungskauffrau
Abschluss:	Versicherungskauffrau

### **Hochschulausbildung**

10/1995 – 07/1996	Diplom-Studiengang Erziehungswissenschaft Pädagogische Hochschule Erfurt/Mühlhausen
10/1999 – 03/2005	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

### **Berufliche Tätigkeit**

05/2005 – 02/2007

Vorbereitungsassistentin Zahnarztpraxis

Dr. med Martina Brauer, Weimar

seit 04/2007

Vorbereitungsassistentin Zahnarztpraxis

Dr. Susanne Ritz, Oberelsbach

Erfurt, den 03.12.2008

## Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Begleitung bei der Erstellung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister und Frau PD Dr. med. Sigrun Eick. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Sigrun Eick für ihre praktische Unterstützung, fachlichen Anregungen und die konstruktiven Vorschläge, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Straube, für die sehr gute Zusammenarbeit und die stetige Bereitstellung der Materialien. Dem molekularbiologischen Institut der Jagiellonen-Universität in Krakau danke ich für die Zurverfügungstellung der Gingipaine.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie für deren Verständnis und tatkräftige Unterstützung.